



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO TACROLIMO
PARA USO TÓPICO: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO

ISABELLA LIMA DANTAS

SÃO CRISTÓVÃO
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO TACROLIMO
PARA USO TÓPICO: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO

ISABELLA LIMA DANTAS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Amélia Moreira Lira

SÃO CRISTÓVÃO

2015

ISABELLA LIMA DANTAS

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO TACROLIMO
PARA USO TÓPICO: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: __/__/__

Orientador (a): Prof. Dr^a Ana Amélia M. Lira

1º Examinador (a): Prof^a. Dr^a. Rogéria de Souza Nunes

2º Examinador (a): Prof^a. Dr^a. Patrícia Severino

PARECER

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus, por tudo, principalmente por não ter permitido que eu desistisse durante os momentos mais difíceis.

Aos meus pais pela tolerância e dedicação.

A Fernando pelo apoio, paciência e compreensão.

À orientadora Prof^a Dr^a Ana Amélia Lira, pela confiança, inspiração e principalmente pela amizade.

À professora Rogéria Nunes, pela acolhida, pelas sugestões e conversas.

Ao professor Vitor Hugo Sarmiento, pela sua contribuição de sempre.

Aos colegas do LADEF: Alyne, Daniele, Gabriela, Joyce, Juliana, Kelven e Micheline, por toda ajuda e pelas boas e descontraídas conversas.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e me dedicaram parte de seu tempo.

RESUMO

A Dermatite Atópica (DA) é uma doença inflamatória cutânea crônica que acomete principalmente pacientes com deficiência na barreira cutânea e com baixa resposta imunológica. O tacrolimo para uso tópico em pomada é um imunomodulador que tem mostrado ser uma boa alternativa para o tratamento da DA. Porém, ele também apresenta efeitos adversos, tais como baixa e variável biodisponibilidade cutânea, sensação de queimação e prurido no sítio de aplicação. Assim, o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas que contornem estas desvantagens é crucial para o sucesso da terapia. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter nanopartículas lipídicas (NL) contendo tacrolimo para uso tópico. As NL foram obtidas pelo método de difusão do solvente associado a ultrassonicação, utilizando o ácido esteárico (AE) e a cera de abelha (CA) como lipídios sólidos nas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e ácido oléico (AO) incorporado à matriz lipídica sólida nos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). As dispersões lipídicas foram caracterizadas através da determinação do tamanho de partícula, Índice de Polidispersidade (IPD), Potencial Zeta (PZ) e teor de fármaco nas NL, avaliação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), análises através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Difração de raio-X (DRX) e Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Como resultados, as NL apresentaram tamanho nanométrico, com um diâmetro médio variando de 139 – 274,9 nm e IPD de 0,3 - 0,5. O PZ das NL foi maior do que - |25 mV|. O teor de fármaco encontrado nas NL foi de 2,3 a 3,2 %. Nos resultados de DSC foi observado que o evento endotérmico nas CLN e nas NLS com fármaco foi deslocado para temperaturas menores, sugerindo maior desorganização da estrutura assim como os resultados de DRX, que também revelaram menor cristalinidade. Nos resultados de FTIR não foi observado interação entre o fármaco e os componentes da matriz lipídica. Então, pode ser concluído que as NL desenvolvidas foram obtidas com sucesso e podem representar futuros sistemas promissores para a veiculação do tacrolimo em formulações tópicas.

PALAVRAS-CHAVES: Nanopartículas Lipídicas; Tacrolimo; Dermatite Atópica.

ABSTRACT

The Atopic Dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease that affects patients with disabilities in the skin barrier and low immune response. Tacrolimus ointment for topical use is an immunomodulator that has shown to be a good alternative for the treatment of AD. However, it also has adverse effects such as low and variable bioavailability, burning sensation and itching at the application site. Thus, the development of new dosage forms that overcome these drawbacks is crucial to the success of the therapy. The objective of this study was to obtain lipid nanoparticles (LN) of tacrolimus for future application in AD therapy. The LN were obtained by solvent diffusion method associated with ultrasonication using stearic acid (SA) and beeswax as solid lipid in the solid lipid nanoparticles (SLN) and oleic acid (OA) incorporated into the solid lipid matrix in the carriers lipid nanostructured (NLC). Lipid dispersions were characterized by determining the particle size, Polydispersity Index (PDI), Zeta Potential (ZP) and drug content in the NL. Evaluation by Transmission Electron Microscopy (TEM), analysis by Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD) and Infrared Spectroscopy in the region Fourier Transform (FT-IR). As results, LN presented nano-sized spherical shape with an average diameter ranging from 139 – 274, 9 nm and IPD from 0.3 - 0.5. PZ of LN was higher than $-|25\text{ mV}|$, which ensures the stability of the dispersion. In the results of DSC, it was observed that the endothermic event in the NLC was shifted to lower temperatures. Drug loading of 2,3 a 3,2%. The results of XRD also showed low crystallinity when NLC was compared with SLN. The results of FTIR was not observed interaction between the drug and the lipid components of the matrix. Then, it can be concluded that NL develop were successfully obtained and may represent promising system for the placement of tacrolimus in topical formulations.

KEYWORDS: Lipid Nanoparticles; Tacrolimus; Atopic Dermatitis.

4.2.8	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	46
4.2.9	Análise estatística	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Caracterização dos sistemas obtidos	47
5.1.1	Aspecto visual, tamanho de partícula, Índice de Polidispersidade (IPD) e Potencial Zeta (PZ)	47
5.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	50
5.2	Padronização e validação da metodologia analítica por CLAE/UV	51
5.2.1	Estudo de Interferentes.....	51
5.2.2	Determinação da linearidade	52
5.2.3	Determinação da precisão e exatidão do método analítico	53
5.2.4	Limites de Detecção e de Quantificação.....	54
5.3	Determinação de Teor do fármaco nas nanopartículas lipídicas (%).....	54
5.4	Análise térmica	56
5.4.1	Termogravimetria (TG/DTG)	56
5.4.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	58
5.4.2.1	<i>Análise dos componentes isolados e misturas físicas por DSC</i>	<i>58</i>
5.4.2.2	<i>Análise das nanopartículas lipídicas de ácido esteárico por DSC ..</i>	<i>60</i>
5.4.2.3	<i>Análise das nanopartículas lipídicas de cera de abelha por DSC ..</i>	<i>61</i>
5.4.2.4	<i>Avaliação da interação fármaco:lipídio</i>	<i>63</i>
5.5	Análise de Difração de raio-X (DRX)	65
5.5.1	Análise dos componentes isolados e misturas físicas por DRX.....	65
5.5.2	Análise das nanopartículas de ácido esteárico por DRX	67
5.5.3	Análise de mistura física por DRX	68
5.5.4	Análise das nanopartículas de cera de abelha por DRX.....	69
5.6	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	71
	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da fisiopatologia da dermatite atópica.....	19
Figura 2: Fórmula estrutural do Tacrolimo	22
Figura 3: Equilíbrio do tacrolimo em solução aquosa	23
Figura 4: Mecanismo de ação celular do tacrolimo	26
Figura 5: Esquema simplificado de uma nanopartícula lipídica sólida (NLS).	27
Figura 6: Esquema simplificado de um carreador lipídico nanoestruturado (CLN)....	28
Figura 7: Esquema simplificado de tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). I. CLN imperfeitos; II. CLN amorfos; III. CLN múltiplos	29
Figura 8: Aspecto visual das amostras NLS - AE; CLN - AE; NLS - CA e CLN - CA.	50
Figura 9: Micrografias de MET das nanopartículas preparadas. (A): NLS – AE/Fármaco; (B): NLS – CA; (C): CLN – AE/Fármaco; (D): CLN – CA.....	51
Figura 10: Cromatograma do sobrenadante de NL inerte (A), NL inerte liofilizada (B) e do tacrolimo 100 µg/mL (C).	52
Figura 11: Curva analítica obtida para o tacrolimo	53
Figura 12: Cromatograma do sobrenadante de NL com fármaco (A) e da amostra de NL com fármaco liofilizada (B).....	55
Figura 13: Curvas de TG/DTG tacrolimo, Phospholipon [®] 80H, ácido esteárico (AE) e cera de abelha (CA).	56
Figura 14: Curvas de DSC dos componentes e das misturas físicas (Mistura 1: Ácido esteárico + ácido oléico (30%) e Mistura 2: Cera de abelha + ácido oléico (30%))..	58
Figura 15: Curvas de DSC do AE, Phospholipon [®] 80H, tacrolimo e das NLS e CLN de AE inertes e com fármaco (FK).	60
Figura 16: Curvas de DSC da CA, Phospholipon [®] 80H, tacrolimo e das NLS e CLN de CA inertes e com fármaco (FK).	62
Figura 17: Análise da curva de DSC de AE recristalizado (preto) e Mistura 3 (vermelho).	63
Figura 18: Análise da curva de DSC de CA recristalizada (preto) e Mistura 4 (vermelho).	64
Figura 19: Difrátogramas dos componentes e das misturas binárias (Mistura 1: Ácido esteárico + ácido oléico (30%) e Mistura 2: Cera de abelha + ácido oléico (30%)) e do AE puro.	65

Figura 20: Difractogramas das NL de AE inertes e com fármaco (FK).	67
Figura 21: Difractograma do AE recristalizado (preto), do fármaco (vermelho) e da Mistura 3 (azul).....	68
Figura 22: Difractogramas das NL de CA inertes e com fármaco (FK).	69
Figura 23: Espectro de FTIR do tacrolimo.....	71
Figura 24: Espectro de FTIR do AE, Phospholipon® 80H e Mistura 5 na região de 2100 a 300 cm ⁻¹	72
Figura 25: Espectro de FTIR do tacrolimo, NLS – AE inerte e NLS – AE/FK na região de 2100 a 300 cm ⁻¹	73
Figura 26: Espectro de FTIR do AE, tacrolimo e Mistura 3 na região de 2100 a 300 cm ⁻¹	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Números de onda (cm^{-1}) do espectro de infravermelho do tacrolimo.	23
Tabela 2: Composição das NLS de AE e CA desenvolvidas.	39
Tabela 3: Caracterização por tamanho médio, IPD, PZ e aspecto visual das NLS inertes de AE e CA.	47
Tabela 4: Caracterização por tamanho médio, IPD, PZ e aspecto das NLS e CLN de AE e CA inertes e com tacrolimo a 0,1%.	48
Tabela 5: Resultado do DP e CV% de cada ponto da curva analítica do tacrolimo. .	53
Tabela 6: Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão do tacrolimo.	54
Tabela 7: Determinação do Teor (%) das amostras de NL desenvolvidas.	55
Tabela 8: Valores de transição endotérmica dos componentes e misturas físicas. ..	58
Tabela 9: Valores de transição endotérmica das amostras de NL de AE inerte e com fármaco (FK).	60
Tabela 10: Valores de transição endotérmica das amostras de NL de CA inerte e com fármaco (FK).	62

LISTA DE EQUAÇÕES

Eq 144

Eq 245

Eq 343

Eq 443

Eq 544

Eq 644

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Ácido esteárico
CA	Cera de abelha
CL	Célula de Langerhans
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CsA	Cefalosporina A
DA	Dermatite atópica
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
E	Eosinófilo
EC	Estrato córneo
FK	Fármaco
FK506	Tacrolimo
FKBP-12	Proteína de ligação do tacrolimo
FTIR	Espectro de infravermelho com transformada de Fourier
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos
HPV	Papilomavirus humano
HSV	Herpes simplex
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IPD	Índice de polidispersidade
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mistura 1	Ácido esteárico + ácido oléico
Mistura 2	Cera de abelha + ácido oléico
mø	Macrófago

NF-AT	Fator nuclear de linfócito T ativado
NL	Nanopartícula lipídica
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RANTES	Quimiotáticos para timócitos
TG	Termogravimetria
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
θ	Theta
λ	Comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

Dermatite Atópica (DA), também conhecida como eczema atópico, é um tipo de doença inflamatória cutânea crônica caracterizada por lesões eritematosas, prurido e descamação. Acomete predominantemente a faixa etária pediátrica (10 – 25 % das crianças com menos de cinco anos) (LEUNG; SOTER, 2001; PETRY *et al.*, 2012; RYBOJAD, 2012); pacientes com deficiência na barreira cutânea; com baixa resposta imunológica (LEUNG *et al.*, 2004) e pacientes de regiões com menores variações de temperatura, como Norte e Nordeste do Brasil (SOLÉ *et al.*, 2006).

O papel central na patogênese da doença segundo Alomar *et al.* (2004) é a disfunção na ativação das células T, com produção de citocinas. A doença pode desaparecer espontaneamente por volta dos quatro anos de idade em 70 % das crianças. Já antes da puberdade, 90 % das crianças vão estar em remissão completa, podendo ainda haver recaída na adolescência ou na idade adulta (RYBOJAD, 2012).

Para o controle da DA não é necessário somente o uso de terapias farmacológicas como o uso de corticosteróides, antihistamínicos, antisépticos e antibióticos, como também é de extrema importância a compreensão da família, evitando transtornos ao doente, de modo que impeça que a doença afete sua qualidade de vida (PALLER *et al.*, 2001; TOMAŠKOVIĆ *et al.*, 2013).

Apesar do controle da doença ser efetivo e bem tolerado com o uso de anti-inflamatórios corticosteróides tópicos, em longo prazo estes podem provocar efeitos adversos, devido a efeitos inibidores do sistema imunológico da pele e da resposta inflamatória provocada. Estes efeitos incluem atrofia cutânea, hipopigmentação, estrias, infecções secundárias e foliculite, limitando o uso prolongado desses medicamentos (PALLER *et al.*, 2001; TOMAŠKOVIĆ *et al.*, 2013). Além disso, a depender da extensão da área de administração, pode ocorrer uma significativa absorção do fármaco resultando em efeitos adversos sistêmicos, principalmente em crianças devido à razão entre a superfície de aplicação do corticóide e sua massa corporal ser maior do que nos adultos (PALLER *et al.*, 2001; PETRY *et al.*, 2012).

Os imunomoduladores derivados dos macrolídeos como o tacrolimo estão sendo uma boa alternativa para o tratamento da DA, já que inibem a calcineurina e a

ativação das células T (SCHACHNER *et al.*, 2005), apresentado maior eficácia e menores efeitos colaterais quando comparado aos corticosteróides tópicos (GARG *et al.*, 2013). O tacrolimo tópico, comercializado como o Protopic® em pomada (0,03 % e 0,1 %), tem-se mostrado efetivo e bem tolerado no tratamento da DA de crianças e adultos respectivamente. Entretanto, também pode causar alguns efeitos adversos, tais como sensação de queimação, fotossensibilidade a luz solar e prurido no sítio de aplicação. Além disso, a administração tópica do tacrolimo pode resultar em baixa e variável biodisponibilidade cutânea, como também pode aumentar o risco de infecções por alterar a resposta imune local (ZAHIR *et al.*, 2001; SPERGEL; LEUNG, 2006).

Visando a resolução ou minimização desses inconvenientes, diversos autores têm estudado e empregado alguns sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas poliméricas e lipídicas, para veiculação do tacrolimo (PARK *et al.*, 2009; ALI *et al.*, 2010; PPOPLE; SINGH; NAM; PARK *et al.*, 2011; MEHNERT; DAS *et al.* 2012; BOER *et al.* 2013; RAHMAN *et al.*, 2014).

As nanopartículas lipídicas (NL) são sistemas de liberação de fármacos que possuem vantagens em relação às outras formulações farmacêuticas tópicas por melhorar a estabilidade de fármacos, promover melhor penetração do agente encapsulado na pele (FANG *et al.*, 2008), liberar o fármaco de forma controlada fazendo com que haja uma minimização da absorção sistêmica (VAGHASIYA *et al.*, 2013) e diminuir possíveis irritações da pele provocada pelo fármaco. Estes benefícios consequentemente ocasionam uma melhor adesão do paciente ao tratamento.

No tratamento da DA, além da compreensão da família do paciente afetado para ajudar a aliviar os sintomas da doença e poder modificar a sua progressão, tendo em vista que a DA já é um problema de Saúde Pública (RYBOJAD, 2012), é importante e necessário também utilizar formulações que promovam um tratamento eficaz e seguro. Dentro deste contexto, as NL apresentam características ideais para veiculação do tacrolimo de modo que podem favorecer a diminuição da irritação cutânea e melhorar a eficácia e a segurança clínica do fármaco no tratamento dermatológico da DA (GARG *et al.*, 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver NL contendo tacrolimo para aplicação tópica e tratamento futuro da DA.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Dermatite Atópica e seu tratamento

A DA é um tipo de doença inflamatória cutânea eczematosa crônica que diminui a barreira epidérmica de modo que reduz os níveis de ceramidas e de produção de profilagrina, uma proteína insolúvel produzida pelos queratinócitos (LEUNG *et al.*, 2004; JENSEN *et al.*, 2011). A DA apresenta períodos de remissão e exacerbação, e o prurido intenso e eritematoso representa o seu principal sintoma (GONTIJO *et al.*, 2008). Acomete predominantemente a faixa etária pediátrica, com 10 – 25 % dos casos iniciando nos primeiros cinco anos de vida, sem distinção de etnia (SCHACHNER *et al.*, 2005).

Solé *et al.* (2006) demonstraram que a prevalência da DA e sintomas relacionados é maior em locais de baixa latitude e menores variações de temperatura, assim como também é variável no Brasil, porém, tem índices significativamente mais elevados nas regiões Norte e Nordeste, apesar de que as variantes mais graves da doença serem mais freqüentes na Região Sul. No Brasil a prevalência da DA varia de 5,3 % a 13 % em crianças e 3,4 % a 7,9 % em adolescentes.

O estudo realizado pelo International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), o qual foi realizado através da aplicação de questionário em 20 cidades brasileiras para 23.422 escolares brasileiros de seis a sete anos de idade e para a 58.144 adolescentes de treze a quatorze anos de idade, mostrou a prevalência da DA (eczema atual, *rash* cutâneo pruriginoso que aparece e desaparece por pelo menos 6 meses no último ano; eczema flexural, *rash* em locais característicos; eczema grave, prurido intenso no último ano) relativamente maior no Norte e Nordeste do que nos outros Estados. As prevalências médias entre os escolares foram de eczema, 11,5 % nas cidades de Nova Iguaçu, Natal e Aracaju; eczema flexural, 8,2 % em Natal, Aracaju e Nova Iguaçu; e eczema grave, 5,0 % em Natal e Aracaju. As prevalências de eczema nos adolescentes foram de 8,9 % em Belém, Aracaju e Salvador; eczema flexural, 5,0 % em Aracaju, Vitória da Conquista e Natal; e eczema grave, 4,4 % em Salvador e Aracaju (CASTRO *et al.*, 2006; SOLÉ *et al.*, 2006).

A DA ocorre por atopia, com característica poligênica, onde o sistema imune também pode sofrer predisposição hereditária para desencadear as reações de hipersensibilidade mediadas pela imunoglobulina E (IgE). Essa condição é chamada de DA extrínseca, que pode ou não combinar com outras doenças atópicas, como a asma e a rinite alérgica (tríade atópica). Outro subtipo de DA é a intrínseca, que não está associada à IgE. Porém, a hereditariedade é encontrada na maioria dos casos (70 %), segundo Rybojad (2012).

A doença é considerada de etiologia complexa de modo que envolve a ativação de mecanismos imunológicos e inflamatórios. Seu fenótipo clínico característico é resultado de suscetibilidade genética, fatores individuais, defeitos na barreira cutânea e também na resposta imunológica local e sistêmica (LEUNG *et al.*, 2004). A disfunção na ativação das células T com produção de citocinas representa papel central na patogênese da DA (ALOMAR *et al.*, 2004), porém, uma deficiência na função de barreira inata de vários epitélios de superfície também pode tornar possível o seu desenvolvimento, devido a penetração de alérgenos, induzindo reações alérgicas tipo IV, mediada por IgE (RYBOJAD, 2012). A Figura 1: Esquema da fisiopatologia da dermatite atópica (LEUNG *et al.*, 2001). CL = célula de Langerhans; E = eosinófilo; mØ = macrófago; IgE = imunoglobulina E; Th1 e Th2 = linfócitos; IL = interleucinas; IFN γ = interferon gama. ilustra o esquema da fisiopatologia da DA, com participação das célula de Langerhans (CL) com maior afinidade a IgE; participação predominante das células Th2 e liberação de suas citocinas (interleucina IL-4, IL-5, IL-13) na fase aguda da lesão, levando à produção de IgE e predominante participação das células Th1 ativadas pela ação das Th2, com atração de macrófagos (mØ) e eosinófilos (E), produção e liberação de interleucina-12 (IL-12) e interferon gama (IFN γ) na fase crônica da lesão (RODRIGUES *et al.*, 2004).

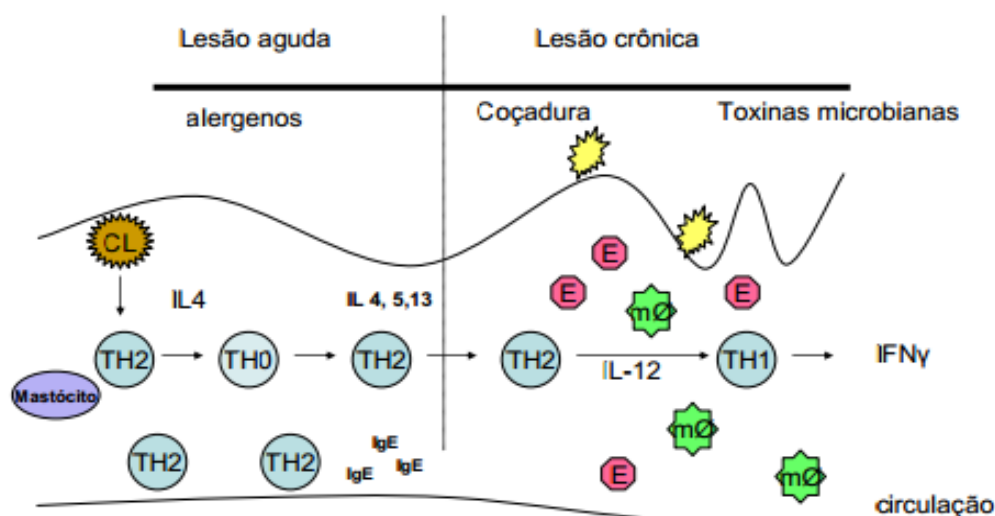


Figura 1: Esquema da fisiopatologia da dermatite atópica (LEUNG et al., 2001). CL = célula de Langerhans; E = eosinófilo; mφ = macrófago; IgE = imunoglobulina E; Th1 e Th2 = linfócitos; IL = interleucinas; IFNγ = interferon gama.

Quando há perda da função da barreira, com anormalidades do EC e aumento da perda de água transepidérmica, a pele passa a sofrer as consequências das agressões, e o trauma mecânico causado pelo ato de coçar é uma delas. Esse tipo de trauma pode resultar em lesões cutâneas uma vez que afeta os queratinócitos, que por sua vez aumentam a expressão de citocinas e quimiocinas, como GM-CSF (fator de crescimento de colônias de granulócitos), TNFα (fator de necrose alfa) e interleucina-1β (IL-1β). Em resposta a produção de TNFα e IFNγ, ocorre também a liberação da proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), RANTES (quimiotáticos para timócitos) e IL-8, que irão contribuir para a permanência de células inflamatórias e continuação da resposta inflamatória na pele por longos períodos da vida do doente (CASTRO *et al.*, 2006).

O quadro clínico da DA pode apresentar-se de forma leve, ou seja, localizada, de forma moderada, ou de forma mais grave, generalizada, e suas características clínicas vão variar de acordo com a idade do paciente. Na fase infantil, que se inicia no terceiro mês de vida, as lesões são eritomatosas, apresentam pápulas e vesículas e são muito pruriginosas, localizam-se predominantemente na face e superfície extensora dos membros. Já na fase que antecede a puberdade as lesões provocam espessamento, escurecimento e

acentuação dos sulcos da pele, assim como também acontece na fase adulta, localizando-se em áreas variadas (CASTRO *et al.*, 2006; PORTO *et al.*, 2010).

Também é importante saber que a pele com DA pode ser alvo de infecções bacterianas, principalmente por *Staphylococcus aureus*; infecções virais como o herpes simplex (HSV) e o papilomavírus humano (HPV), entre outros agentes infectantes como os fungos, sobretudo os do gênero *Malassezia* (BOGUNIEWICZ *et al.*, 2006; RYBOJAD, 2012), apresentando lesões semelhantes. É devido à semelhança entre as lesões, que é necessário saber reconhecê-las individualmente, através da uniformização do diagnóstico clínico, como por exemplo, utilizando o critério de diagnóstico proposto por Hanifin-Rajka, e realização de estudos epidemiológicos. Porém, a realização de exames como hemograma que revela eosinofilia, exames mais específicos como o teste molecular PCR (reação em cadeia da polimerase), ou análise de cultura obtida através de vesículas intactas também são importantes para auxiliar no diagnóstico (RODRIGUES *et al.*, 2004; BOGUNIEWICZ *et al.*, 2006).

A DA é considerada um problema de Saúde Pública, tendo em vista que esta doença provoca transtornos familiares graves, tendo efeito profundo na qualidade de vida do paciente, ao ponto que compromete sua autoestima, seu desempenho escolar e suas atividades de trabalho e lazer. Portanto, o seu controle requer muito esforço e cuidados por parte do doente e por parte de todos os familiares envolvidos, necessitando de uma abordagem ampla. É importante o emprego de medidas ambientais que garantam a diminuição da exposição a agentes infecciosos e medidas comportamentais como: hidratação frequente da pele, com o uso de emolientes; banhos rápidos e em temperatura amena; minimizar o uso de sabonete; somente usar roupas leves e frescas; entre outras, além das medidas farmacológicas (PALLER *et al.*, 2001; TOMAŠKOVIĆ *et al.*, 2013).

As medidas farmacológicas incluem os tratamentos adjuvantes, com utilização de antihistamínicos orais, antisépticos ou antibióticos locais ou orais, e uso de anti-inflamatórios corticosteroides tópicos, os quais representam a base do tratamento farmacológico. Estes corticosteroides tópicos são efetivos devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, porém, bem tolerados apenas no uso em curto prazo, pois, seus efeitos adversos, onde se incluem a atrofia cutânea, hipopigmentação, estrias, infecções secundárias e foliculite, são relativamente freqüentes e limitam o uso prolongado desses medicamentos

(PALLER *et al.*, 2001; TOMAŠKOVIĆ *et al.*, 2013). Além disso, o uso de corticosteroides tópicos em áreas corporais extensas ou sobre oclusão pode resultar em significativa absorção sistêmica. E são crianças, particularmente, as mais suscetíveis aos eventos adversos sistêmicos, como supressão do eixo hipotálamo-hipofiseadrenal, doença de Cushing e osteonecrose da cabeça do fêmur. Isso ocorre devido à razão entre a superfície de aplicação do corticóide e a sua massa corporal ser maior nas crianças do que nos adultos, resultando em níveis endógenos maiores de fármaco (PALLER *et al.*, 2001; SCHACHNER *et al.*, 2005).

Outros tratamentos a serem considerados incluem a fototerapia, o uso do micofenolato de mofetila, azatioprina, e gamaglobulina intravenosa, contudo, devem ser prescritos com cautela, apenas por especialistas na patologia, devido aos seus efeitos tóxicos potenciais (BOGUNIEWICZ *et al.*, 2006).

Os imunossupressores tópicos conhecidos como inibidores da calcineurina, tais como o tacrolimo e o pimecrolimo, tem se destacado no tratamento na DA por serem mais eficientes e mais seguros do que os corticosteróides tópicos (GARG *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2004). O mecanismo de ação desses imunossupressores tópicos é a inibição da enzima calcineurina fosfatase que provoca inibição das citocinas, com consequente supressão da resposta dos linfócitos T (GOEBEL *et al.*, 2011; GARG *et al.*, 2013).

1.2 Tacrolimo

Tacrolimo, também denominado pelo laboratório Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão) de FK506, é um macrolídeo lactona com uma α,β -dicetoamida hemiacetal incorporada a um anel de 23 estruturas, apresentando a fórmula molecular $C_{44}H_{69}NO_{12}H_2O$, geralmente na forma monohidratada. A sua fórmula estrutural está ilustrada na Figura 2.

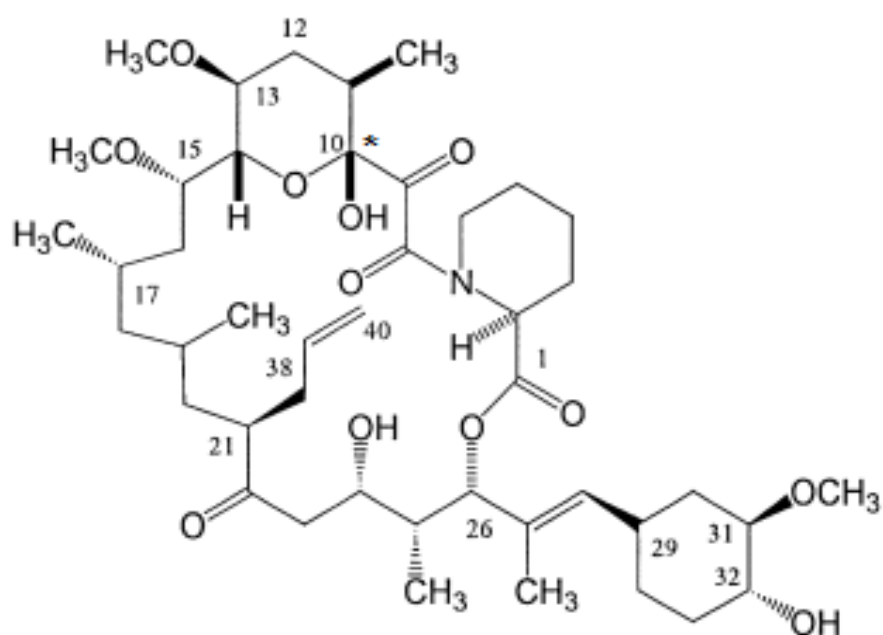


Figura 2: Fórmula estrutural do Tacrolimo. *Carbono do hemiacetal.

Em relação às propriedades estruturais o tacrolimo apresenta-se de forma diferenciada quando comparada a outros fármacos, pois, possui dois tipos de heterogeneidade conformacional, podendo apresentar isomerização cis-trans envolvendo a ligação amida e sua restrição rotacional ou podendo, quando em solução aquosa, epimerizar para o tautômero I (cis) que é posteriormente convertido no tautômero II (cis-trans) levando a um equilíbrio que contém as três formas (Figura 3).

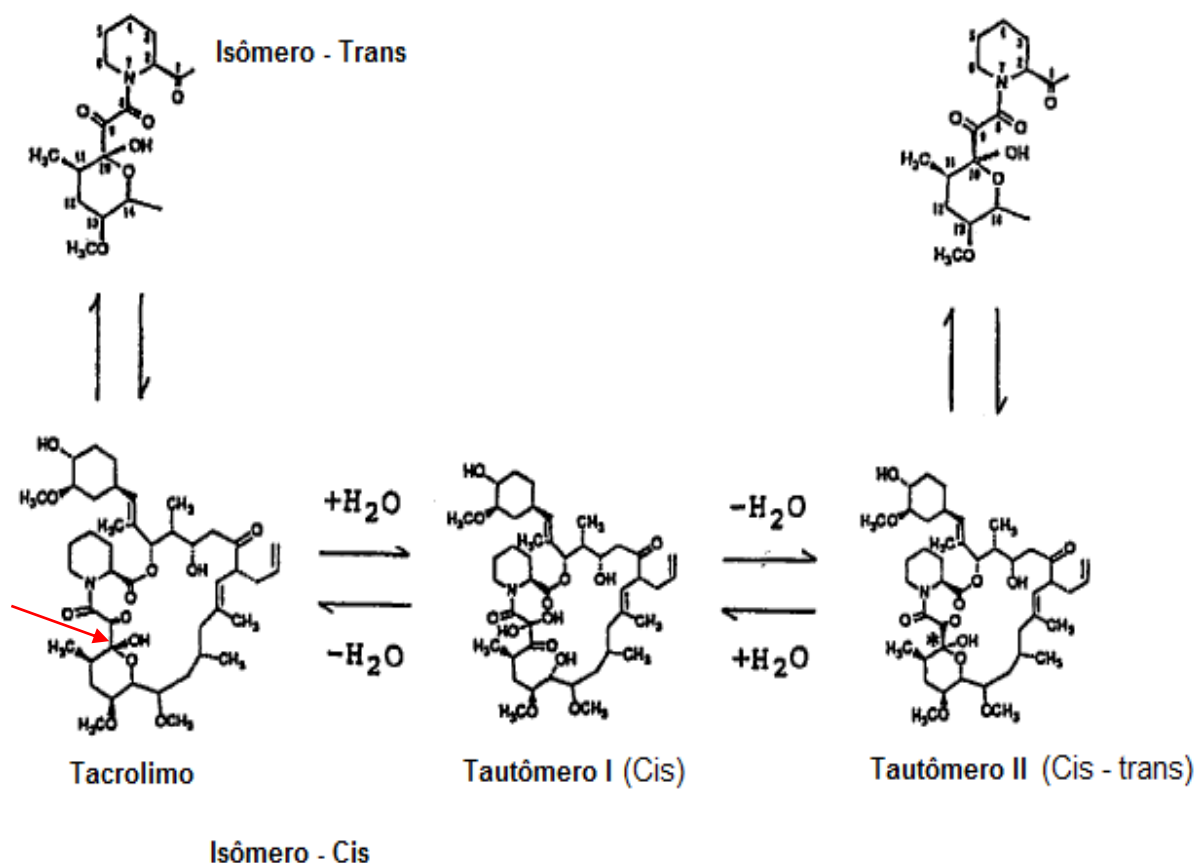


Figura 3: Equilíbrio do tacrolimo em solução aquosa. A seta na estrutura do tacrolimo indica o centro de epimerização. Fonte: Adaptado de NAMIKI et al., 1995.

O fármaco em estudo apresenta em sua estrutura química grupos funcionais hidroxila, carbonila e amida, que podem ser identificados através do seu espectro de FTIR (Tabela 1).

Tabela 1: Números de onda (cm^{-1}) do espectro de infravermelho do tacrolimo. Fonte: Adaptado de Namiki *et al.*, 1993 e Shah *et al.*, 2010.

Estiramento	Comprimento de onda (cm^{-1})
OH	3450
C=O de éster e cetona	1741, 1725 e 1690
C=C e N-H	1639
C-O de éster	1194
C-O-C de éter	1172 e 1093
C-H de alcanos	2810

Em geral, o tacrolimo é um ácido fraco encontrado como cristais brancos ou como pó cristalino, sendo ligeiramente solúvel em hidrocarbonetos saturados, altamente solúvel em solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, éter, acetona entre outros, e também altamente solúvel em lípidos (BOER *et al.*, 2013; MOREIRA, 2008). Apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, alta massa molecular ($822,05 \text{ g mol}^{-1}$), o que pode resultar em dificuldade de incorporação em formulações convencionais e baixa permeação cutânea, além de apresentar lipofilicidade elevada ($\text{Log P } 3,96 \pm 0,83$) (GOEBEL *et al.*, 2011).

Segundo Venkataramanan *et al.* (1987), o ponto de fusão do tacrolimo se encontra na faixa de 127 a 130 °C, e quando no seu estado sólido é estável em temperaturas de 24 a 40 °C por pelo menos um período de seis meses.

O tacrolimo é um fármaco com atividade imunossupressora que foi isolado do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, encontrado pela primeira vez no solo em Tsukuba, no Japão (GOTO *et al.*, 1987; BARREIRO *et al.*, 2012). Desde 1987, tem se mostrado como alternativa terapêutica, sendo bastante utilizado na prevenção de rejeição de transplantes de órgãos em todo o mundo (GARCIA *et al.*, 2004; GARG *et al.*, 2013). Em 2003, devido à sua eficácia, foi o inibidor de calcineurina mais utilizado nos transplantes realizados nos Estados Unidos da América (SILVA *et al.*, 2011).

A ação imunossupressora do tacrolimo não é afetada por sua heterogeneidade conformacional, e pode ser comparada com outro potente imunossupressor, a ciclosporina A (CsA), que apesar de possuir estrutura química diferente, possui mecanismo de ação similar (GARCIA *et al.*, 2004). Porém, segundo Garcia *et al.* (2004) e outros autores, como Goebel *et al.* (2011) e Garg *et al.* (2013), a atividade imunossupressora do tacrolimo é 50-100 vezes mais elevadas *in vitro* e 10-20 vezes mais elevada *in vivo*, do que a da CsA.

Estudos clínicos demonstraram que o tacrolimo é mais eficaz do que a CsA em concentrações mais baixas, tem perfil de segurança superior, não induz hipertensão arterial sistêmica e anormalidades lipídicas (hipercolesterolemia e hiperlipidemia) como acontece com a CsA, além de também causar menor nefrotoxicidade e neurotoxicidade relacionada à dose quando administrado via oral ou via parenteral (GARCIA *et al.*, 2004; GOEBEL *et al.*, 2011; GARG *et al.*, 2013).

O tacrolimo pertence a uma nova classe de fármacos não esteroidais, os inibidores da calcineurina (BARREIRO *et al.*, 2012), e diversos estudos têm

demonstrado que ele é capaz de reduzir os níveis de IL-6, em modelo de artrite induzida por colágeno *in vivo*; no tratamento de algumas inflamações oculares refratárias aos métodos terapêuticos convencionais (MAGARI *et al.*, 2004; GOLDBLATT & ISEMBERG, 2005; JOSEPH *et al.*, 2005); tratamento de doenças inflamatórias do cólon (BENSON *et al.*, 2008), assim como também tem mostrado notável eficácia na terapia da DA (ALLOMAR *et al.*, 2004; GOEBEL *et al.*, 2011).

Por via tópica, o tacrolimo age na célula T da pele afetada prevenindo sua ativação e suprimindo a liberação de citocinas inflamatórias, como a IL-2 e o IFN γ . A Figura 4 esquematiza o mecanismo de ação do tacrolimo, mostrando que sua molécula ao penetrar no citoplasma dos linfócitos, localizados na derme, liga-se à proteína intracelular FKBP-12, que se associam aos receptores de glicocorticóides ou de progesterona através da ação de proteínas de fase aguda da inflamação. Na seqüência é formado um complexo com cálcio, calmodulina e calcineurina, inibindo a atividade da fosfatase da calcineurina. Isso impede a desfosforilação e a translocação do fator nuclear do linfócito T ativado (NF-AT) citoplasmático, impedindo a união com sua subunidade nuclear. Na ausência desse passo, os linfócitos T não podem sintetizar e secretar citocinas, mimetizando o efeito dos corticóides. Com o bloqueio na síntese de citocinas, os eventos que resultariam nos sinais e sintomas da DA são interrompidos (GONTIJO *et al.*, 2008; GOEBEL *et al.*, 2011; BARREIRO *et al.*, 2012).

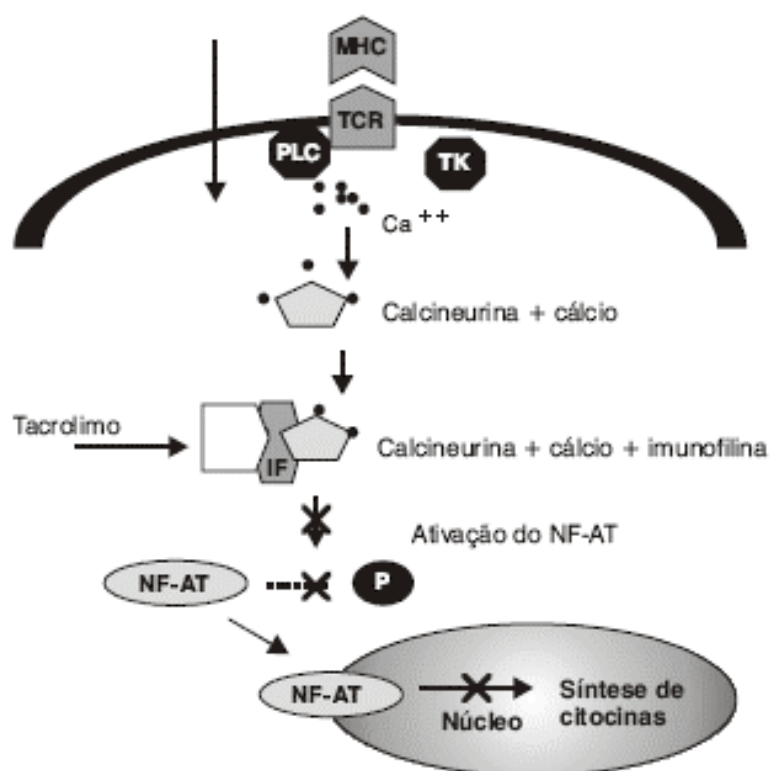


Figura 4: Mecanismo de ação celular do tacrolimo (CASTRO *et al.*, 2006).

Em 2002, nos Estados Unidos, o tacrolimo tópico foi disponibilizado comercialmente na forma de pomada (ALOMAR *et al.*, 2004; GOEBEL *et al.*, 2011) porém, só foi lançado no Brasil em 2005 (GONTIJO *et al.*, 2008), e desde então, ao contrário do que acontece com a CsA, seu uso tópico está sendo eficaz (GARG *et al.*, 2013). Sua atual apresentação farmacêutica de uso tópico é o Protopic[®], em pomada 0,1% para uso em adultos e em pomada 0,03 % para uso em crianças até dois anos de idade (GOEBEL *et al.*, 2011).

Apesar da eficácia superior a CsA e a outros fármacos no tratamento da DA, o tacrolimo apresenta efeitos adversos tais como sensação de queimação, fotossensibilidade a luz solar e prurido no sítio de aplicação, além de aumentar potencialmente o risco de infecções cutâneas por alterar a resposta imune cutânea local. Portanto, diante dos benefícios do tratamento com tacrolimo associado ao potencial do fármaco em causar as reações adversas citadas, formas farmacêuticas alternativas estão sendo constantemente propostas para melhorar a terapia e a adesão do paciente ao tratamento (PALLAKI; SHIN *et al.*, 2010; NAM; POPLE *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2012; POPLE *et al.*, 2013; RAHMAN *et al.*, 2014).

Atualmente, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como as NL, tem se apresentado como um promissor campo de pesquisa na terapia tópica visando o aumento da estabilidade, veiculação de compostos insolúveis, otimização da liberação do fármaco, promoção da penetração cutânea e melhora da biodisponibilidade cutânea do fármaco (MARCATO *et al.*, 2009; ZHUANG *et al.*, 2010; GOEBEL *et al.*, 2011; MEHNERT; DAS; MONTENEGRO *et al.*, 2012; VAGHASIYA *et al.*, 2013).

1.3 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e Carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)

As NL do tipo NLS foram desenvolvidas no início dos anos 90 (MULLER *et al.*, 2002; PARDEIKE *et al.*, 2009), como sistema carreador coloidal de primeira geração para liberação controlada de fármacos. Estes sistemas são caracterizados por apresentarem diâmetro médio das partículas entre 100 e 300 nm, porém, partículas com diâmetros na faixa de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a 50 nm também podem ser obtidas, dependendo do método de obtenção empregado (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). São constituídas por uma matriz, que é formada por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e corporal, e por tensoativos (Figura 4), fisiologicamente bem tolerados pelo corpo (DONG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013), podendo apresentar até 100 vezes menos toxicidade do que as nanopartículas poliméricas segundo Marcato *et al.* (2009).

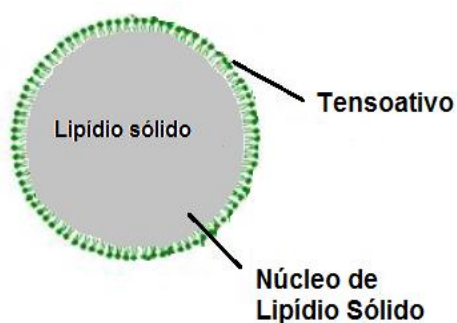


Figura 5: Esquema simplificado de uma nanopartícula lipídica sólida (NLS).

A estrutura das NLS, com sua matriz formada por lipídeos sólidos confere menor mobilidade ao fármaco neles incorporados podendo sustentar, ou até controlar, a velocidade de liberação destas substâncias (MEHNERT, MADER, 2012; RICCI-JÚNIOR *et al.* 2006), além de poder proteger o fármaco contra degradação química (MEHNERT *et al.*, 2001; MEHNERT *et al.*, 2012). Porém, a desvantagem das NLS é a sua baixa capacidade de encapsulação devido a alta organização da sua estrutura cristalina, que vai variar de acordo com alguns fatores como solubilidade do fármaco na matriz lipídica, estado polimórfico do lipídio e método de obtenção das nanopartículas (MARCATO *et al.*, 2009). Já as NL do tipo CLN surgiram no final dos anos 90, com a finalidade de aperfeiçoar e reduzir inconvenientes das NLS, como melhorar a capacidade de encapsular o fármaco e diminuir a expulsão das partículas durante o armazenamento (SOUTO *et al.*, 2004; MARCATO *et al.*, 2009; ZHUANG *et al.*, 2010). Esse tipo de nanocarreador, considerado como de segunda geração, apresentam imperfeições (espaços) no interior de sua matriz lipídica sólida (estrutura cristalina), devido a presença de lipídio líquido ou plástico, que causam inconsistência com as cadeias carbônicas do lipídio sólido (PARDEIKE *et al.*, 2009) como ilustra a Figura 5.

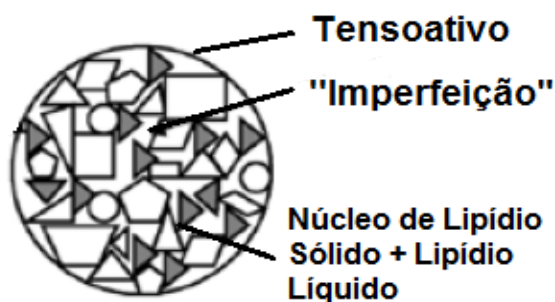


Figura 6: Esquema simplificado de um carreador lipídico nanoestruturado (CLN).

Os CLN estão atraindo maior atenção como novos carreadores coloidais de fármacos para uso tópico (FANG *et al.*, 2008) devido as vantagens mencionadas acima e por promoverem maior estabilidade física e química em longo prazo, além de apresentarem eficácia e segurança clínica superior aos outros sistemas coloidais (MULLER *et al.*, 2002).

Os CLN podem se apresentar como três tipos de estruturas diferentes: os CLN imperfeitos, que é uma mistura de lipídio sólido com baixa proporção de lipídio líquido, o que aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos lipídios,

ocasionando imperfeições na estrutura e assim, geram mais espaço para acomodar o fármaco, aumentando a eficiência de encapsulação; os CLN amorfos, que é uma mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos em alta quantidade gerando partículas em um estado sólido amorfo, evitando-se assim, a ocorrência de recristalização e expulsão do ativo das partículas, pois, o processo de cristalização do lipídio para a forma β (mais estável) não ocorre nessas condições; e os CLN múltiplos, que é constituído de grande quantidade de lipídio líquido em lipídio sólido dispersos em água, de forma que a solubilidade das moléculas de lipídio líquido no lipídio sólido é excedida, o que leva a uma separação de fases e a formação de nanocompartimentos de lipídio líquido dentro da matriz lipídica sólida (WISSING *et al.*, 2004; SOUTO *et al.*, 2005; MARCATO *et al.*, 2009) como ilustra a Figura 6.

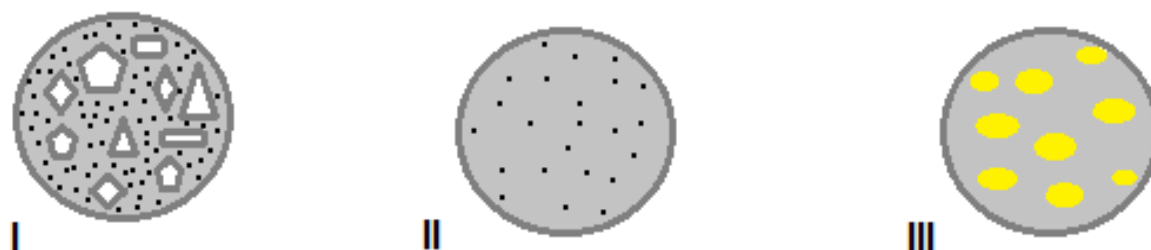


Figura 7: Esquema simplificado de tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). I. CLN imperfeitos; II. CLN amorfos; III. CLN múltiplos (Adaptado de MARCATO *et al.*, 2009).

Ambos os sistemas coloidais carreadores possuem uma série de características vantajosas para a via de aplicação tópica devido a sua composição biodegradável e baixa toxicidade (SOUTO *et al.*, 2004). E apesar de existirem muitos estudos sobre esses sistemas para utilização por via oral e parenteral, atualmente, segundo Das *et al.* (2012), o foco de pesquisas está sendo a sua administração tópica, tanto com finalidade terapêutica quanto com finalidade cosmética. Esses sistemas possuem vantagens, devido ao pequeno tamanho de suas partículas que assegura que as nanopartículas estejam em contato próximo com o EC. Isso promove uma maior oclusão no local aplicado, aumentando o teor de água, podendo ser assim considerado também como um excelente veículo de hidratação, além de que, deste modo, pode promover um aumento da penetração do fármaco na pele (MULLER *et al.*, 2002). NL também mostram diversas vantagens em relação a outros sistemas de liberação de fármacos (emulsões, lipossomas e nanopartículas

poliméricas), como uma boa tolerabilidade local; melhor estabilidade do fármaco; aumento da biodisponibilidade tópica; facilidade de incorporar fármacos lipofílicos (MONTENEGRO *et al.*, 2012); aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos dos fármacos (ITALIA *et al.*, 2009). Além disso, esses sistemas também vêm gerando um interesse muito grande pela viabilidade de produção em escala industrial (MEHNERT *et al.*, 2001; MEHNERT *et al.*, 2012).

Muitos métodos para a produção de nanopartículas lipídicas têm sido descritas na literatura (PARDEIKE *et al.*, 2009). Um deles é o método de homogeneização por alta pressão, que é amplamente utilizada na indústria, incluindo a indústria farmacêutica durante a produção, por exemplo, de emulsões para aplicação na nutrição parenteral. Ele tem muitas vantagens, tais como possibilidade de transposição de escala, evita o uso de solventes orgânicos e necessita de um curto tempo de produção, quando comparada com outro método (MEHNERT *et al.*, 2001; PARDEIKE *et al.*, 2009; MEHNERT *et al.*, 2012). Este método pode ser realizado à quente, que é quando o procedimento ocorre a temperaturas elevadas, ou por homogeneização à frio, que é quando é realizado em temperaturas abaixo da temperatura ambiente (MULLER *et al.*, 2000). Para realização deste método é necessário equipamento específico, o homogeneizador a alta pressão (100 - 2000 bar), o qual possui um estreito orifício por onde o fluido vai ser deslocado, provocando assim uma alta tensão de cisalhamento e força de cavitação, que rompem as gotículas até a sua obtenção em tamanhos nanométricos (MEHNERT;MADER, 2001).

Outro método é o de microemulsão à quente, que apesar de ser um método simples, tem a desvantagem de necessitar de elevada concentração de tensoativo e co-tensoativo. Neste método as microemulsões contendo lipídio fundido, tensoativo, co-tensoativo e água são preparadas por agitação, e por fim adiciona-se a microemulsão quente em uma solução de tensoativo fria, o que irá resultar na solidificação das NL (MARCATO *et al.*, 2009).

As NL também podem ser preparadas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente. Para realização deste método não é necessário o aquecimento, o que é uma vantagem para produção de NL veiculando ativos termosensíveis, porém, tem como desvantagem o solvente residual presente no final do processo (UNER, 2006).

Outro método bastante utilizado é o de difusão do solvente, que também tem suas vantagens quando comparada a outros métodos, por ser uma técnica simples, rápida e de fácil obtenção. Ela consiste no aquecimento do lipídio (5 °C – 10 °C acima do ponto de fusão do lipídio sólido) e dispersão do lipídio fundido à quente em solvente orgânico solúvel em água, por exemplo, acetona e/ou álcool etílico, com posterior adição, sob agitação, da solução de tensoativo na mesma temperatura. Por fim, acontece o resfriamento da dispersão, seguido da evaporação do solvente orgânico à baixa pressão (HU *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2006).

A ultrassonicação também está sendo bastante utilizada associada às técnicas de difusão/evaporação do solvente com o objetivo de reduzir o tamanho das nanopartículas obtidas. Consiste na sonicação do material usando uma sonda de ultrassom a temperatura de pelo menos 5 °C acima do ponto de fusão do lipídio sólido utilizado no processo. Após sonicação, a amostra é imediatamente colocada em recipiente com gelo e resfriada até a temperatura de 5 °C. Assim, obtém-se a dispersão de NL (DAS *et al.*, 2012).

A literatura mostra que para obtenção das NL, os lipídeos mais utilizados são os triglicerídeos, glicídeos parciais, ácidos graxos como o ácido esteárico (AE), esteróis e ceras naturais como a cera de abelha (CA) e a cera de carnaúba (LIPPACHER *et al.*, 2001; MAIA *et al.*, 2000a; MADER; MEHNERT, 2001), porém, a escolha desse lipídio vai depender do material que será encapsulado, da técnica de produção das nanopartículas e do mecanismo de liberação desejado.

Neste estudo, o AE - ácido graxo saturado de caráter lipofílico, com cadeia longa de 18 carbonos e a CA foram os lipídios sólidos escolhidos para a preparação das NLS, assim como também foram escolhidos para a preparação dos CLN, juntamente com o ácido oléico (AO) - lipídio líquido.

O AE foi selecionado por ser um lipídio bastante relatado na literatura na obtenção de NL devido a sua biocompatibilidade com os tecidos humanos e baixa toxicidade (YUAN *et al.*, 2007; WEYENBERG *et al.*, 2007; SEVERINO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Já a CA, composta por hidrocarbonetos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, álcoois e diésteres, foi selecionada juntamente com o AE para ser utilizada como lipídio sólido na obtenção das nanopartículas por ser uma cera natural de baixo custo e grande importância econômica no Nordeste (ATTAMA *et al.*, 2008; BONVEHI *et al.*, 2012). Além de que, a utilização da CA pela indústria

cosmética e farmacêutica de maneira sustentável agrega valor a esta e gera emprego e renda para a região.

A escolha dos lipídios utilizados para do desenvolvimento de NL necessita da compreensão de suas características de cristalização. A forma polimórfica do lipídio deve ser conhecida, pois, dependendo da forma em que se encontre após o processo de obtenção das nanopartículas, influencia na capacidade de encapsulação do fármaco. A fusão, o resfriamento, a utilização de solvente, entre outras etapas do processo de obtenção das nanopartículas podem levar o lipídio a transições entre a forma polimórfica instável (α), metaestável (β') ou estável (β) (SILVA *et al.*, 2011), e segundo Severino *et al.*, (2011), a transformação de formas menos estáveis para formas mais estáveis é um processo irreversível.

Neste estudo a escolha dos tensoativos foi feita para que se obtivesse um sistema mais estável e com partículas de tamanho e propriedades de superfície adequados. Então, foi utilizado o Phospholipon[®] 80H, fosfolipídio de propriedades anfifílicas. Ele tem a função de revestir a superfície das nanopartículas, assim como também pode atuar como um intensificador de penetração para substâncias de aplicação tópica (SCHMIDTS *et al.*, 2009). Os fosfolipídios podem aumentar a capacidade de incorporação do fármaco de modo que são capazes de formar micelas invertidas dentro da matrix lipídica da NL (SCHUBERT *et al.*, 2006), além de poder melhorar o desempenho de liberação do fármaco, de forma que, quando adicionado na matriz lipídica podem levar a diminuição da tensão interfacial, estabilizando as superfícies formadas durante sua produção, levando a diminuição do tamanho de partícula (SCHUBERT *et al.*, 2005; ATTAMA *et al.*, 2007; SALMINEN *et al.*, 2014).

O Phospholipon[®] 80H fornece carga negativa à superfície da partícula (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003) e quando utilizado junto com uma determinada e variável concentração de tensoativo de caráter não-iônico, como neste estudo, o Polissorbato 80 (Tween[®] 80 %), possivelmente promoverão modificações de PZ, de forma que quando adsorvidos na superfície, tendem a reduzir este valor absoluto de PZ e diminuir o tamanho das partículas (GARG; SINGH, 2011).

Tanto as NLS como os CLN podem promover a penetração cutânea de fármacos (FANG *et al.*, 2008; MONTENEGRO *et al.*, 2012), gerando na pele níveis maiores do que quando aplicado na sua forma livre, já que eles, com seus tamanhos reduzidos, podem penetrar nos apêndices da pele e nas camadas superficiais do EC

(DAS *et al.*, 2012; VAGHASIYA *et al.*, 2013). Assim, ambos os sistemas foram selecionados para serem empregados neste estudo e comparados.

1.4 Nanopartículas lipídicas para aplicação tópica

A pele como via de administração está ganhando destaque por ter vantagens em comparação com outras vias, devido a minimizar os efeitos colaterais relacionados as flutuações plasmáticas decorrentes da administração oral, ser indolor, não invasiva e não sofrer metabolismo de primeira passagem hepático (KENAEY *et al.*, 2012; GOEBEL *et al.*, 2011). Ela é composta pela epiderme, derme, hipoderme e apêndices cutâneos. A epiderme é a camada mais externa e apresenta em sua superfície o EC, que protege a pele contra o ambiente externo por ser formado por células mortas e queratinosas. O EC também é responsável pelo controle da penetração/permeação de componentes na pele e pela eficácia clínica tópica (SILVA *et al.*, 2010).

A derme é constituída por tecido conjutivo, onde encontramos os fibroblastos, células de controle imunológico, inervações e outros tipos celulares responsáveis pela sustentação e nutrição da pele (KOROTKOV; GARCIA, 2012). É na derme que são localizados os anexos da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Outra camada da pele é a hipoderme, a camada mais profunda, também chamada de tecido subcutâneo. Ela se une aos órgãos subjacentes e é formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas. Esta camada atua como uma barreira de proteção térmica e mecânica da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KOROTKOV; GARCIA, 2012).

O objetivo do tratamento tópico (via cutânea) de doenças dermatológicas é o direcionamento da substância ativa até as células afetadas da pele (JESEN *et al.*, 2011). Para esse direcionamento acontecer, é necessário que haja a penetração do fármaco na pele, a qual é afetada por vários fatores, tais como espessura da pele no local de aplicação, temperatura, grau de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo local, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, etnia, pH na superfície da pele e integridade do EC (WOKOVICH *et al.*, 2006; JESEN *et al.*, 2011).

Outros aspectos a serem levados em consideração para penetração do fármaco na pele são os inerentes à formulação, pois a natureza do fármaco e o tipo de forma farmacêutica interferem demasiadamente neste processo. O fluxo transdérmico é grandemente influenciado pelo coeficiente de partição e pela solubilidade em água, visto que moléculas de alta polaridade e de grande tamanho encontram dificuldade para penetração (SWART *et al.*, 2005). Portanto, as características ótimas para a absorção percutânea são, principalmente, baixa massa molecular e solubilidade adequada em meios hidrofílico e hidrofóbico. No entanto, a quantidade que penetra na pele depende quase sempre da forma farmacêutica utilizada (BRAIN *et al.*, 2007).

Desta forma, as nanopartículas lipídicas vêm cada vez mais sendo estudada como ótima opção para o uso tópico de fármacos, e estão sendo bastante utilizadas, visto que, apresentam boa estabilidade física, aumentam a estabilidade de agentes ativos que sofrem hidrólise, oxidação e decomposição fotoquímica, podem incorporar fármacos de caráter lipofílico e melhoram a biodisponibilidade cutânea desse fármaco (CASTRO & FERREIRA, 2008; JENNING & GOHLA, 2001).

Em consonância, a penetração na pele é reforçada por esse sistema de liberação, principalmente devido a um aumento de sua hidratação, o que é ocasionada pela formação de uma película oclusiva na superfície da pele (MULLER *et al.*, 2002; BENSON, 2005).

Em 2011, Pople & Shin desenvolveram géis contendo CLN para veicular o tacrolimo com finalidade de uso tópico. Dando continuidade ao estudo, em 2013, Pople e colaboradores obtiveram elevada eficiência de encapsulação de 96,66% e mostraram melhores resultados em comparação a formulação tópica comercial, como o aumento da biodisponibilidade *in vivo*, maior penetração cutânea e melhor perfil de liberação *in vitro*. Outros trabalhos também têm incorporado o tacrolimo em NL como alternativa mais segura, estável ou eficaz (PALLAKI *et al.*, 2010; NAM; PARK *et al.*, 2011; GAO; YOSHIDA *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.*, 2014). Em todos os trabalhos referenciados, as nanopartículas foram obtidas por homogeneização a alta pressão empregando lipídios diferentes do proposto neste estudo. Além disso, o método usado neste trabalho foi o de difusão de solvente associado ao método de ultrassonicação. Apesar dos trabalhos referenciados acima apresentarem resultados benéficos, até o momento nenhuma formulação contendo o tacrolimo nanoencapsulado encontra-se disponível no mercado. Isso justifica a busca contínua

no desenvolvimento de novas formulações para melhorar a eficácia e segurança clínica do uso do tacrolimo para o tratamento dermatológico da DA (GARG *et al.*, 2013). Desta forma, o presente estudo é necessário, pois, além de representar o desenvolvimento de sistemas promissores para a veiculação do tacrolimo em formulações tópicas, utiliza a associação de técnicas simples, rápidas e de fácil obtenção, além de utilizar componentes biodegradáveis, de baixa toxicidade e de baixo custo.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo Geral

Obter NL à base de AE e CA, contendo 0,1% de tacrolimo, pelo método de difusão do solvente associado ao método de ultrassonicação para a aplicação tópica.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os principais componentes utilizados para o desenvolvimento das NL;
- Desenvolver NLS e CLN à base de lipídios diferentes;
- Incorporar o tacrolimo nas NL;
- Avaliar a influência da incorporação do tacrolimo nas NL obtidas;
- Caracterizar os sistemas obtidos;
- Padronizar a metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do tacrolimo nas NL;
- Determinar o teor de fármaco nas NL;
- Avaliar a influência dos diferentes lipídios sólidos empregados na obtenção das NL;
- Avaliar a influência do lipídio líquido incorporado na matriz lipídica das NL;
- Avaliar interação tacrolimo/excipientes.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matérias-primas e solventes:

- Acetonitrila (PANREAC[®]);
- Ácido Esteárico (SIGMA-ALDRICH[®]);
- Ácido Fosfórico (SYNTH[®]);
- Ácido Oléico (SYNTH[®]);
- Água ultrapura (MILLI-Q[®]);
- Álcool Etílico Absoluto (NEON[®]);
- Cera de Abelha (GM CERAS);
- Phospholipon 80H (LIPOID[®]);
- Tacrolimo comercial (PHARMANOSTRA[®]);
- Tween 80 (VETEC[®]).

3.1.2 Equipamentos e acessórios:

- Agitador magnético (FISATOM[®] 752A);
- Balança analítica (DENVER INSTRUMENT[®] APX-200);
- Centrífuga (EPPENDORF[®] 5804R);
- Coluna (MARCHEREY-NAGEL[®] EC 250/4.6 Nucleodur 100-5 C18ec)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE/UV (INSTRUMENT CO. LTD YL9100);
- Drybox (ARSEC DCV040)
- DRX - Difração de Raio-X (PANALYTICAL[®] Empyrean);
- DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial (TA INSTRUMENTS[®] Q20);
- Espectrofotômetro UV-VIS (FENTOM[®] 800 XI);
- FTIR- Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (SHIMADZU[®] IRPrestige-21);
- Liofilizador (TERRONI LS 3000)
- Membrana PTFE 0,2 µm (SARTORIUS STEDIM Minisart SRP 15)

- Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL® JEM-1400PLUS)
- Porta-amostra de Cu (ELETRONIC MICROSCOPY SCIENCES);
- Sonicador (VIBRACELL® CV18);
- TG (TA INSTRUMENTS® Q50);
- Tubo de ultrafiltração (VIVASPIN® Turbo 15);
- Ultra-turrax (IKA® T25);
- Zetasize (MALVERN INSTRUMENTS®, UK).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das nanopartículas lipídicas (NL)

Inicialmente NLS foram obtidas com a finalidade de encontrar as condições experimentais adequadas para melhor preparação das NL. Nessa etapa foram preparadas NLS de AE ou CA inertes pelo método de difusão do solvente (HU *et al.*, 2002) associado a ultrassonicação (DAS *et al.*, 2012). O AE foi escolhido para ser utilizado como lipídio modelo neste estudo em comparação com a CA.

Para a preparação das NLS inertes, cada lipídio sólido foi fundido, junto com o Phospholipon® 80H a uma temperatura de aproximadamente 5 - 10 °C maior que seu ponto de fusão. A cada um deles foi adicionado etanol e em seguida, a solução aquosa contendo o Tween® 80, na mesma temperatura, foi vertida na solução orgânica contendo a fase lipídica, e imediatamente submetida à homogeneização em Ultra-turrax (IKA® T25, 14000 rpm, 3 minutos). Posteriormente as amostras foram levadas ao Sonicador (VIBRACELL® CV18) por 5 minutos a aproximadamente 75 °C e depois foram colocadas em banho de gelo até atingir a temperatura de 5 °C. Finalmente, as formulações preparadas foram levadas à agitação magnética por 24 horas para a evaporação do solvente.

Essas NLS foram obtidas variando as proporções das misturas dos tensoativos utilizados (Tween® 80% e Phospholipon® 80H) e mantendo constante a concentração do lipídio e etanol. A Tabela 2 apresenta a composição destas formulações. Em seguida, todas as amostras preparadas foram caracterizadas e avaliadas.

Tabela 2: Composição das NLS de AE e CA desenvolvidas.

Amostra	AE (mg)	CA (mg)	Tween 80 (mg)	Phospolipon 80H (mg)	Etanol (mL)	Água q.s (mL)
A1	480	-	2.400	-	9	120
B1	480	-	2.100	300	9	120
C1	480	-	1.800	600	9	120
D1	480	-	1.500	900	9	120
E1	480	-	1.200	1.200	9	120
A2	-	480	2.400	-	9	120
B2	-	480	2.100	300	9	120
C2	-	480	1.800	600	9	120
D2	-	480	1.500	900	9	120
E2	-	480	1.200	1.200	9	120

A partir dos resultados obtidos nesta etapa, duas formulações foram selecionadas, a primeira utilizando AE e a segunda CA como lipídios sólidos. A partir delas, carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) também foram obtidos, pela incorporação de 30% de lipídio líquido, ácido oleico (AO), em relação ao lipídio sólido, na fase lipídica.

O tacrolimo 0,1% também foi incorporado nestas formulações.

As modificações que serviram como parâmetros na avaliação das nanopartículas obtidas neste estudo foram: (1) o lipídio empregado, (2) a adição do AO à matriz lipídica e (3) a incorporação do fármaco.

Para a preparação das NL contendo o fármaco, o procedimento foi similar ao relatado anteriormente, porém, após a etapa de fusão do lipídio, foi adicionado o tacrolimo (0,1 %, m/V) solubilizado em etanol.

Todas as amostras foram desenvolvidas no Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor José Aloísio de Campos (São Cristóvão, SE).

3.2.2 Preparação das amostras

As dispersões obtidas na etapa anterior (3.2.1) foram centrifugadas utilizando tubos de ultrafiltração (VIVASPIN® Turbo 15) a 4000 rpm por 40 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi retirado e as nanopartículas sedimentadas foram dispersas em água ultrapura e centrifugadas novamente por 30 minutos para retirar excesso dos tensoativos. O sedimento das nanopartículas foi congelado a uma temperatura de aproximadamente - 20 °C e posteriormente liofilizado por 48 horas em liofilizador (TERRONI LS 3000). As amostras liofilizadas foram empregadas nas análises de teor do fármaco, DSC, TG/DTG, DRX e FTIR.

Amostras das misturas físicas de lipídios também foram preparadas, na mesma proporção das NL (Mistura 1: 70 % AE + 30 % AO e Mistura 2: 70 % CA + 30 % AO). Para obtenção das misturas citadas, as massas dos lipídios foram fundidas conjuntamente, a \pm 75 °C, e a seguir, o sistema fundido foi resfriado em temperatura ambiente.

O AE e a CA isolados também foram recristalizados na presença de etanol com o objetivo de avaliar a interferência do processo de recristalização nas NL. Para obtenção dessas amostras, separadamente, os lipídios foram primeiramente fundidos a aproximadamente 75 °C, e em seguida o etanol foi adicionado. Amostras de AE e CA recristalizados contendo o fármaco também foram obtidas nas mesmas condições (Misturas 3 e 4, respectivamente), porém, o fármaco foi solubilizado em etanol antes desse ter sido adicionado aos sistemas. O sistema foi colocado para resfriar e secar em temperatura ambiente por 5 dias.

Amostra da mistura física de AE com Phospholipon® 80H (Mistura 5), na mesma proporção em que as NL foram preparadas. O lipídio foi fundido juntamente com o tensoativo sob temperatura de aproximadamente 75 °C, e a seguir, foi adicionado etanol (na mesma concentração utilizada nas NL). O sistema foi colocado para resfriar e secar em temperatura ambiente por 5 dias. Todas as amostras foram coletadas para posterior análise.

3.2.3 Caracterização dos sistemas obtidos

3.2.3.1 *Aspecto visual, tamanho de partícula, Índice de Polidispersidade (IPD) e Potencial Zeta (PZ)*

As dispersões foram inicialmente observadas macroscopicamente e classificadas como homogênea ou heterogênea, de acordo com a presença de sedimentos na amostra. Posteriormente, foi realizado a determinação do tamanho das partículas e IPD pelo método de espectroscopia de correlação de fóton. A determinação do PZ foi realizada utilizando o mesmo equipamento, um Zetasizer (MALVERN INSTRUMENTS®, UK) do Laboratório Pólo de Novos Materiais no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor José Aloísio de Campos (São Cristóvão, SE). Para esta análise, as amostras em triplicata foram diluídas em água ultrapura (1: 20).

3.2.3.2 *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Para obtenção de imagens diretas, avaliação da distribuição de diâmetro da partícula e observação da sua formação, amostras das dispersões lipídicas inertes e com fármaco foram analisadas através da MET. Para isso, as amostras foram inicialmente diluídas em água ultrapura (1: 200). Cerca de 5 µL de cada amostra foi depositada sobre grades do porta-amostra de Cu com recobrimento de filme de carbono de 400 mesh. Após 10 minutos foi adicionado cerca de 5 µL de uma solução de ácido fosfotúngstico (PTA) 1% como agente de contraste (GARG; SINGH, 2011). Em seguida, as grades de cobre foram colocadas para secar em dessecador por 24h e depois examinadas utilizando Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL® JEM-1400PLUS) do Centro Multiusuário de Nanotecnologia da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor José Aloísio de Campos (São Cristóvão, SE).

3.2.4 Padronização e validação da metodologia analítica por CLAE/UV

Todas as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE, utilizando-se detector ultravioleta (UV/VIS) em comprimento de onda de 210 nm (POPLE *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2013).

Para escolha do método, foram realizadas variações de alguns parâmetros como tipo de coluna; fase móvel; solução diluente; fluxo; temperatura, até encontrar as melhores condições para absorção do tacrolimo.

A metodologia foi validada de acordo os critérios estabelecidos na Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, descrita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, para garantir a confiabilidade dos resultados, obedecendo aos seus parâmetros e critérios de aceitação como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ), e limite de detecção (LD).

3.2.4.1 *Estudo de Interferentes*

Para a análise de estudo de interferentes, que tem a finalidade de avaliar exatamente um determinado composto em presença de outros componentes da formulação (BRASIL, 2003), 1 mL de sobrenadante das NL inertes foi adicionado em balão de 10 mL e o volume completado com acetonitrila. Em seguida as amostras foram filtradas em membrana PTFE 0,2 µm e analisadas por CLAE/UV. Esse estudo também foi realizado utilizando as amostras liofilizadas de NL inertes, onde 20 mg de cada NL foi fundido em temperatura na faixa de 80 °C e posteriormente solubilizado em 8 mL de acetonitrila. O volume foi completado para 10 mL com água ultrapura, para precipitação do lipídio. Então, as amostras foram filtradas em membrana PTFE 0,2 µm e também analisadas por CLAE/UV.

3.2.4.2 *Determinação da linearidade*

Inicialmente, soluções estoque de tacrolimo (200 µg/mL) em acetonitrila:água (80:20 v/v) foram preparadas. Em seguida, três curvas analíticas foram obtidas a partir das soluções estoque em cinco diferentes concentrações: 20, 40, 50, 100 e 200 µg/ mL. A avaliação da linearidade foi feita mediante análise das

três curvas analíticas e do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva, do coeficiente de correlação linear (r) e da equação da reta.

Esta análise é necessária, pois, determina a capacidade da metodologia analítica demonstrar se os resultados obtidos foram diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra (BRASIL, 2003).

3.2.4.3 *Determinação da precisão e exatidão do método analítico*

Para determinação da precisão e exatidão do tacrolimo em solução diluente acetonitrila: água ultrapura (80:20 v/v), os pontos de concentrações baixa (20 µg/mL), média (100 µg/mL) e alta (200 µg/mL) foram analisados em quintuplicata (n=5). A precisão avaliou a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla, não sendo permitido valores acima de 5 %, e foi calculada pela equação de CV%:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

Eq 1

A exatidão (E%) foi calculada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro da concentração utilizada, podendo apenas variar de 95 a 105%. (BRASIL, 2003). Foi utilizada a seguinte equação:

$$E\% = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração Teórica}}$$

Eq 2

3.2.4.4 *Limites de Detecção e de Quantificação*

Os limites de detecção e quantificação foram determinados de acordo com os modelos matemáticos propostos pela Resolução 899/2003 da ANVISA. Tais modelos são descritos nas equações a seguir:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Eq 1

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Eq 3

Onde,

LD = Limite de Detecção

LQ = Limite de Quantificação

DP_a = Desvio Padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo 3 curvas analíticas

IC = Inclinação da curva analítica

3.2.5 Determinação de Teor do fármaco nas nanopartículas lipídicas (%)

A determinação do teor foi calculada através da quantificação do fármaco não encapsulado no sobrenadante removido após centrifugação da dispersão das NL conforme descrito no item 4.2.2. Para isso foi utilizado 1 mL de sobrenadante das NL contendo fármaco em balão de 5 mL. O volume foi completado com acetonitrila e a dispersão filtrada em membrana PTFE 0,2 µm antes da análise por CLAE/UV. Além disso, o teor também foi determinado através da quantificação do fármaco nas NL liofilizadas. Para isso, 20 mg de amostra liofilizada de NL contendo fármaco foi fundida em temperatura na faixa de 80 °C e solubilizada em 8 mL de acetonitrila. O volume foi completado para 10 mL utilizando água ultrapura para a precipitação do lipídio. As amostras foram filtradas em membrana PTFE 0,2 µm e analisadas por CLAE/UV (n = 3).

Para calcular o teor do fármaco presente no sobrenadante das NL foi utilizada a equação:

$$Teor (\%) = \frac{(Q_T - Q_{S1}) \times 100}{Q_T - Q_{S1} - Q_L}$$

Eq 4

Onde,

Q_T : Quantidade total de fármaco adicionado à formulação;

Q_{S1} : Quantidade presente no sobrenadante após a primeira centrifugação;

Q_L : Quantidade total de lipídio sólido.

Para obtenção do cálculo do teor nas NL liofilizadas foi utilizado a equação:

$$Teor (\%) = \frac{Q_T \times 100}{Q_A}$$

Eq 5

Onde,

Q_T : Quantidade total de tacrolimo recuperado nas NL;

Q_A : Quantidade de amostra de NL utilizada.

3.2.6 Análise térmica

3.2.6.1 Termogravimetria (TG/DTG)

As curvas TG/DTG do tacrolimo, AE, CA e Phospholipon® 80H foram obtidas utilizando instrumento TA Instruments modelo Q50, sob fluxo de nitrogênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, faixa de temperatura entre 25 – 600 °C, utilizando 4 mg previamente pesadas em cadinho de platina. O equipamento foi previamente calibrado e verificado utilizando amostra padrão de oxalato de cálcio monoidratado. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Alberto Carvalho (Itabaiana, SE).

3.2.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Amostras do tacrolimo, AE, AE recristalizado, CA, Phospholipon® 80H, misturas físicas e das NL de AE e CA liofilizadas foram analisadas por DSC. Curvas de DSC foram obtidas utilizando instrumento TA Instruments modelo Q20, sob fluxo de nitrogênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, sob faixa de temperatura entre 25 - 200 °C, utilizando aproximadamente 4 mg de amostra em cápsulas de alumínio previamente pesadas. O equipamento foi previamente

calibrado utilizando padrão metálico de Zn e Al. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Alberto Carvalho (Itabaiana, SE).

3.2.7 Análise de Difração de raio-X (DRX)

Amostras dos componentes, misturas físicas e das NL de AE e CA foram analisadas em difratômetro Panalytical Empyrean, tubo de Cu, utilizando intervalo angular de 3 a 40°, com velocidade constante de 2 °/min e ângulo de 2 θ (theta) usando radiação K α do Cu. As análises foram realizadas no Laboratório de Preparação de Materiais e Magnetismo no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor Alberto Carvalho (Itabaiana, SE).

3.2.8 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliação da existência de possível interação entre o AE e o Phospholipon[®] 80H ou entre AE e o fármaco foram realizados espectros FTIR do tacrolimo, AE, Phospholipon[®] 80H, das misturas físicas (Misturas 3 e 4) e das amostras liofilizadas de NL de AE inerte e com fármaco. Os espectros foram obtidos utilizando espectrofotômetro FTIR SHIMADZU[®] modelo IRPrestige-21, pelo método KBr, onde as amostras em proporção de 5:1 (KBr:amostra) foram caracterizadas com resolução 16 cm⁻¹, 16 varreduras, faixa de frequência de 4000 – 400 cm⁻¹. Essas análises foram feitas no Laboratório Multiusuários II do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Professor José Aloísio de Campos (São Cristóvão, SE).

3.2.9 Análise estatística

A análise estatística das diferenças entre as diferentes amostras foram analisadas pelo teste ANOVA de um único fator, seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey. Um nível de probabilidade de 0,05 foi considerado como o nível de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos sistemas obtidos

4.1.1 Aspecto visual, tamanho de partícula, Índice de Polidispersidade (IPD) e Potencial Zeta (PZ)

A Tabela 3 apresenta os resultados de tamanho médio, IPD, PZ e aspecto das dispersões de NLS inertes de AE e CA obtidas na etapa de pré-formulação. Observou-se que as amostras E1 e E2 apresentaram menor tamanho de partícula e IPD, além de apresentarem aspecto homogêneo, sem sedimentação. Desta forma, estas formulações foram selecionadas para as etapas posteriores.

Tabela 3: Caracterização por tamanho médio, IPD, PZ e aspecto visual das NLS inertes de AE e CA.

Amostra	Tamanho de partícula (nm)	IPD**	Potencial Zeta (mV)	Aspecto
A1	4714,3	0,6	- 20,3	Heterogênea
B1	6883,0	0,6	- 31	Heterogênea
C1	660,8	0,8	- 27,1	Heterogênea
D1	93,5	0,4	- 25,8	Heterogênea
E1	87,6	0,3	- 39,1	Homogênea
A2	549,5	0,6	- 16,5	Heterogênea
B2	771,8	0,7	- 17,8	Heterogênea
C2	442,63	0,7	- 21,5	Heterogênea
D2	233,0	0,6	- 23,0	Heterogênea
E2	157,0	0,4	- 30,4	Homogênea

**Índice de Polidispersidade

A Tabela 4 apresenta os resultados de tamanho médio de partícula, IPD, PZ e análise macroscópica das NL inertes e com tacrolimo a 0,1%, utilizando o AE ou a CA como lipídio sólido e o AO como lipídio líquido, preparadas a partir das dispersões E1 e E2.

Tabela 4: Caracterização por tamanho médio, IPD, PZ e aspecto das NLS e CLN de AE e CA inertes e com tacrolimo a 0,1%.

Amostra	AE (mg)	CA (mg)	AO (mg)	Tacrolimo (mg)	Tamanho de partícula (nm)	IPD**	PZ (mV)
NLS-AE	480	-	-	-	157,9	0,3	- 49,1
CLN-AE	336	-	144	-	139,1	0,3	- 47,2
NLS-AE/FK	480	-	-	120	167,3	0,3	- 47,7
CLN-AE/FK	336	-	144	120	143,9	0,4	- 37,1
NLS-CA	-	480	-	-	242,9	0,4	- 30,4
CLN-CA	-	336	144	-	214,8	0,3	- 25,5
NLS-CA/FK	-	480	-	120	274,9	0,5	- 33,0
CLN-CA/FK	-	336	144	120	215,3	0,5	- 25,0

**Índice de Polidispersidade

Como pode ser observado, todas as formulações apresentaram tamanho de partícula nanométrico e adequado PZ. Além disso, não foram observadas formulações com aspecto heterogêneo ou com presença de sedimento.

Também foi observado que o tamanho das NL foi influenciado pela adição do fármaco, de modo que houve um pequeno aumento no diâmetro médio das partículas, o que também foi observado por outros autores como Hu *et al.*, (2002); Martins; Das *et al.*, (2012) quando incorporaram diferentes fármacos em NL, indicando que a sua presença provoca uma desordem na estrutura da matriz lipídica tornando - a menos cristalina.

A adição e incorporação de lipídio líquido na matriz lipídica também influenciou o tamanho das partículas, havendo uma redução do seu tamanho. Resultados semelhantes foram descritos na literatura por HU *et al.*, (2005), TIWARI; PATHAK, (2011); GARG; SINGH, 2011 e UPRIT *et al.*, (2013), onde mostram que em geral, os CLN apresentam tamanho de partícula reduzido devido a adição do lipídio líquido em lipídeo sólido originar uma matriz lipídica mais desordenada, que vai exigir menos energia para formação de partículas menores. Também pelo fato da mistura binária do lipídeo no estado líquido com lipídeo sólido diminuir a viscosidade da solução lipídica a ser dispersada na fase aquosa, com isso, a técnica de sonicação pode ser mais eficaz na redução do tamanho das partículas (GARG; SINGH *et al.*, 2011).

Todas as amostras apresentaram valor de PZ adequado, maior do que -25 mV, o que é satisfatório, já que um elevado potencial zeta é indicativo de uma boa estabilidade física das formulações (DAS *et al.*, 2012). A repulsão eletrostática imposta pelas cargas evita a aglomeração de partículas, proporcionando estabilidade à dispersão (HAN *et al.*, 2008; MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2012). Pode-se notar, em geral, que com a adição do fármaco, o PZ das formulações, em módulo, não foi muito diminuído sugerindo que provavelmente não ocorreu interação eletrostática entre o fármaco e a estrutura lipídica (SCHAFFAZICK *et al.* 2003). Observa-se também, que o tipo de lipídio influenciou no valor do PZ das NL, de forma que as NL de CA apresentaram, em módulo, valores mais baixos de PZ, quando comparadas às NL de AE.

Quanto ao resultado do IPD, todas as amostras sugerem uma adequada distribuição de tamanho das partículas já que apresentaram valores abaixo de 0,5, indicando uma baixa tendência para se aglomerarem (GARG; SINGH, 2011). Baixo IPD pode ser ocasionado devido à associação do método de produção com a ultrassonicação e da adequada concentração de tensoativo utilizado na formulação (DAS *et al.*, 2012).

Em relação ao aspecto visual das formulações, o lipídio sólido empregado também influenciou nas características das nanopartículas obtidas. As amostras que apresentaram aspecto mais translúcido foram as amostras de AE, porém, foi observado que apesar da dispersão de nanopartículas utilizando CA como lipídio sólido apresentar-se leitosa e com tamanho de partícula maior que as nanopartículas de AE, também obtiveram aspecto homogêneo, sem sedimentação, como pode ser visualizado na Figura 8.

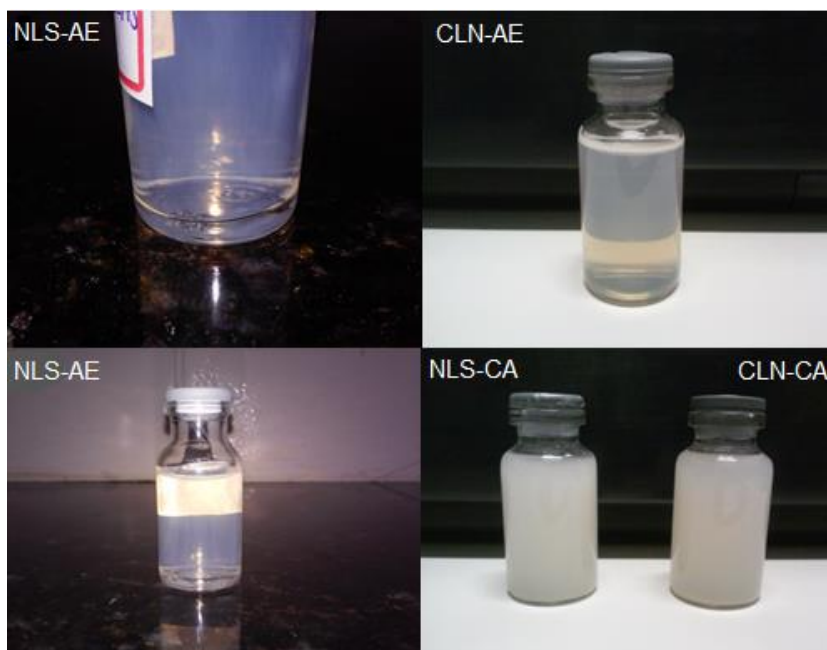


Figura 8: Aspecto visual das amostras NLS - AE; CLN - AE; NLS - CA e CLN - CA.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os resultados de MET obtidos neste trabalho sugerem a obtenção de partículas relativamente esféricas, de tamanho nanométrico, na faixa de 100 – 300 nm (Figura 9). Imagens semelhantes foram obtidas nos trabalhos desenvolvidos por GARG; SINGH; POPLÉ *et al.*, (2011).

Variações na sua forma sempre podem ser esperadas, já que na análise de MET as nanopartículas são expostas a vácuo elevado dentro de uma coluna de feixe de elétrons (HOW *et al.*, 2013). Variações no formato das nanopartículas também podem ser causadas pela influência do tipo de lipídio utilizado, o que pode ser justificado pela suas diferenças de velocidades de cristalização (ATTAMA *et al.*, 2007). Comparando as Figuras 9A e 9B, observamos que as nanopartículas de CA mostraram-se mais esféricas e maiores que as nanopartículas de AE. Houve também uma redução do tamanho das partículas quando o AO foi incorporado às amostras (Figuras 9A e 9B em relação a 9C e 9D, respectivamente).

A formação de estruturas coloidais adicionais também pode existir, especialmente se um excesso do Phospholipon[®] 80H estiver presente na formulação (SCHUBERT *et al.*, 2006). Segundo Schubert *et al.*, (2006); Garg; Singh (2011), a MET também pode mostrar a camada de Phospholipon[®] 80H na superfície da partícula, como pode ser observado na Figura 9A.

Por fim, podemos concluir que os resultados de MET corroboraram com os dados de tamanho de partícula apresentados no item 5.2.1.

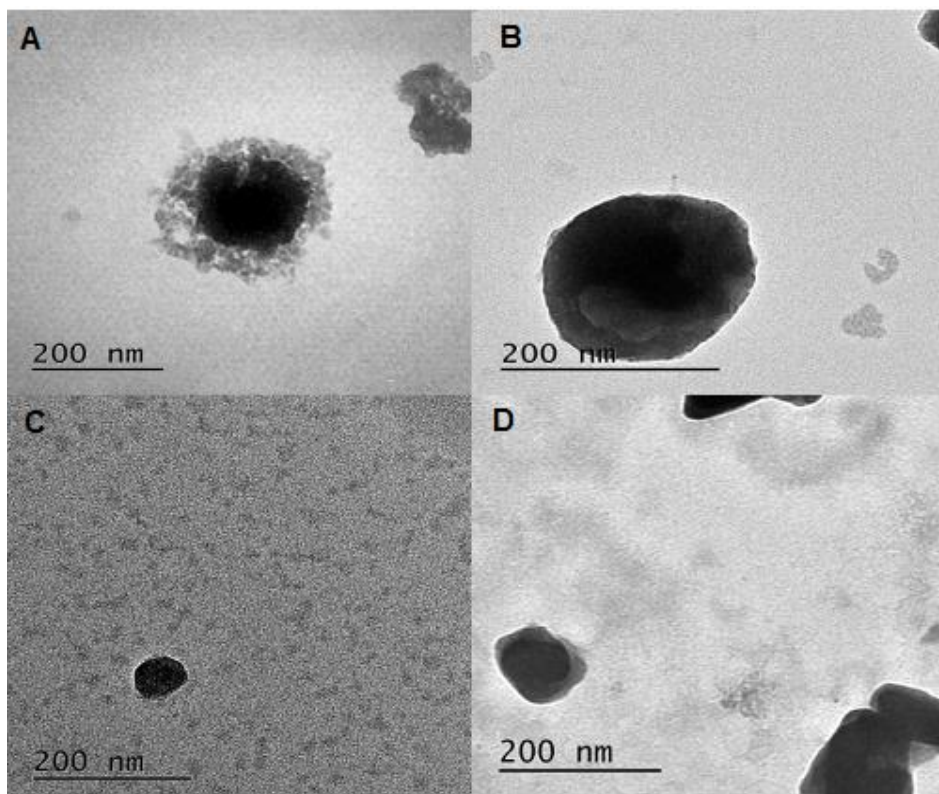


Figura 9: Micrografias de MET das nanopartículas preparadas. (A): NLS – AE/Fármaco; (B): NLS – CA; (C): CLN – AE/Fármaco; (D): CLN – CA.

4.2 Padronização e validação da metodologia analítica por CLAE/UV

4.2.1 Estudo de Interferentes

Amostras de sobrenadante de NL inertes foram analisadas, e pelo método utilizado, não foi possível detectar nenhum tipo de interferente (Figura 10A). Já em relação ao método utilizado para amostras de NL inertes liofilizadas foi observado presença de interferente (Figura 10B), porém, em tempo distinto do tempo de retenção do fármaco (Figura 10C), o que não implicaria na sua identificação e quantificação posteriormente, sugerindo assim, este ser um método seletivo para o estudo.

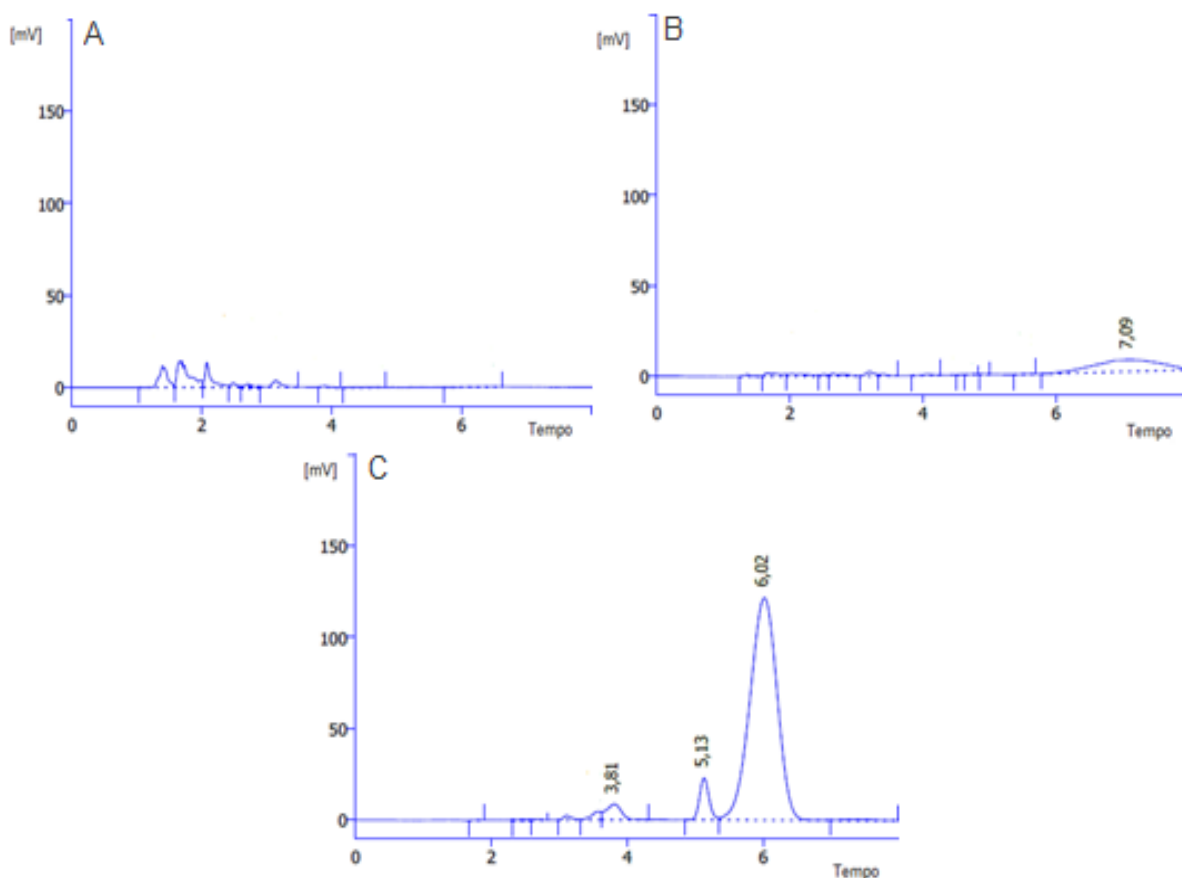


Figura 10: Cromatograma do sobrenadante de NL inerte (A), NL inerte liofilizada (B) e do tacrolimo 100 µg/mL (C).

4.2.2 Determinação da linearidade

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou maior a 0,99. Desta forma, o método utilizado mostrou ser linear na faixa de concentrações de fármaco utilizada (20 – 200 µg/mL), de modo que apresentou (r) de 0,9998, obedecendo aos limites estabelecidos (Figura 11 e Tabela 5).

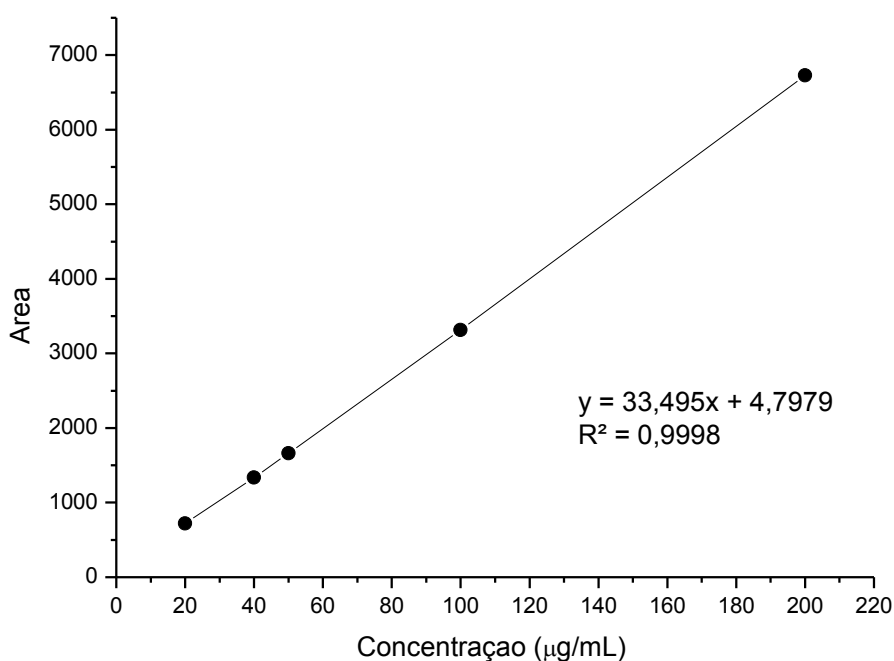


Figura 11: Curva analítica obtida para o tacrolimo

Tabela 5: Resultado do DP e CV% de cada ponto da curva analítica do tacrolimo.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão	CV (%)
20	10,99	1,5
40	18,69	1,3
50	37,31	2,2
100	70,71	2,1
200	18,99	0,2

4.2.3 Determinação da precisão e exatidão do método analítico

Os resultados referentes à precisão e a exatidão do método utilizado para validação do tacrolimo encontram-se na Tabela 6.

De acordo com os resultados obtidos pela equação (Eq 1), foram apresentados CV% abaixo de 5% e de acordo com a equação (Eq 2), resultados de E% acima de 95%. Os resultados apresentados encontram-se de acordo com os valores estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Tabela 6: Resultados obtidos na avaliação da precisão e exatidão do tacrolimo.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
20	19,2	0,9	96,2
100	95,3	0,5	95,4
200	190,6	0,3	95,3

4.2.4 Limites de Detecção e de Quantificação

Os resultados obtidos para limite de detecção de acordo com a equação (Eq 3) foi de 1,14 $\mu\text{g/mL}$ e para o limite de quantificação utilizando a (Eq 4) foi de 3,82 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que a curva de linearidade obtida encontra-se de acordo com os limites calculados.

4.3 Determinação de Teor do fármaco nas nanopartículas lipídicas (%)

A quantificação do tacrolimo incorporado nos sistemas foi avaliada primeiramente nos sobrenadantes das NL. Porém, dentro das condições experimentais utilizadas não foi possível detectar o fármaco nessas amostras (Figura 12A). Isso sugere que a grande maioria do fármaco empregado na formulação está encapsulado nas NL. Então, a quantificação do fármaco também foi realizada nas amostras de NL liofilizadas (Figura 12B), através da equação (Eq 5).

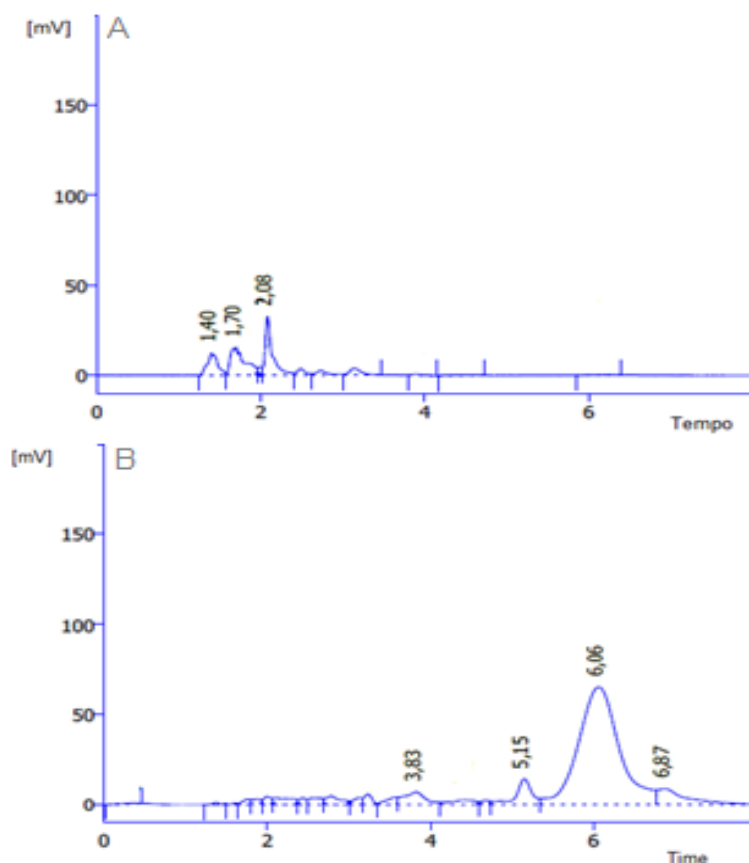


Figura 12: Cromatograma do sobrenadante de NL com fármaco (A) e da amostra de NL com fármaco liofilizada (B).

Foi observado que as NL apresentaram um teor de 2,3 a 3,2% de tacrolimo (Tabela 7). Em geral, as NL de CA apresentaram uma maior quantidade do fármaco encapsulado em relação as NL de AE ($p < 0.05$). Porém, também foi observado que a capacidade de encapsulação dos CLN em relação as NLS não foram significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabela 7: Determinação do Teor (%) das amostras de NL desenvolvidas.

Amostra	Teor (%)
NLS-AE/FK	2,3 \pm 0,03
CLN-AE/FK	2,9 \pm 0,02
NLS-CA/FK	2,9 \pm 0,02
CLN-CA/FK	3,2 \pm 0,04

4.4 Análise térmica

4.4.1 Termogravimetria (TG/DTG)

Para caracterização do AE, CA, Phospholipon[®] 80H e do tacrolimo utilizado na formulação foi feita inicialmente uma análise termogravimétrica para determinar a estabilidade térmica desses componentes, avaliar a viabilidade do desenvolvimento dos sistemas e otimizar a temperatura de análise de DSC (Figura 13).

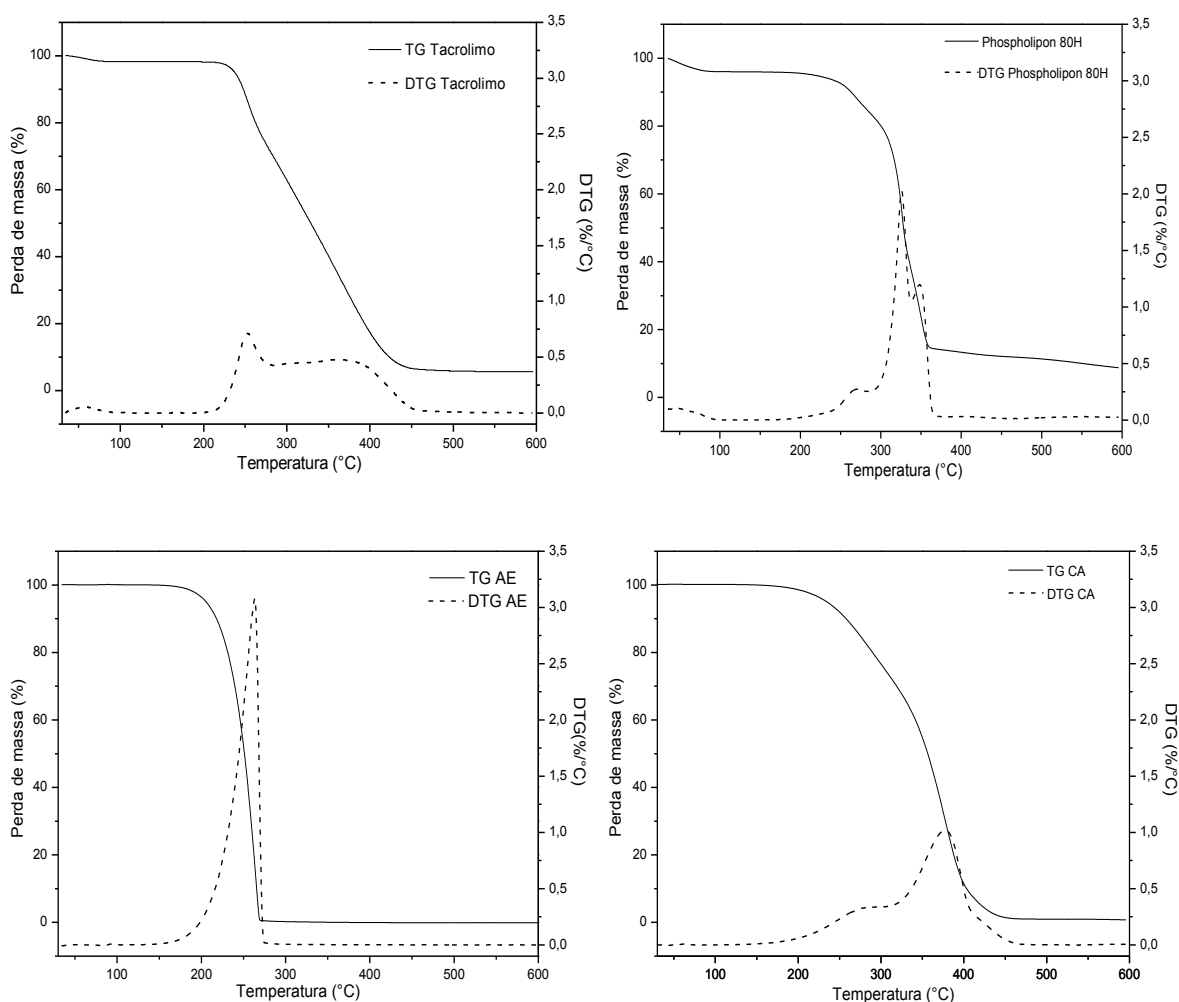


Figura 13: Curvas de TG/DTG tacrolimo, Phospholipon[®] 80H, ácido esteárico (AE) e cera de abelha (CA).

A análise da curva de TG/DTG do AE apresentou perda de massa de $\Delta m_1 = 99.59\%$ ($T_{\text{pico DTG}} \sim 263\text{ }^{\circ}\text{C}$) em uma única etapa, no intervalo de temperatura de $178 - 275\text{ }^{\circ}\text{C}$, dados semelhantes são encontrados na literatura (LERDKANCHANAPORN; DOLLIMORE, 1998). Já na curva termogravimétrica da CA houve perda de massa de $\Delta m_1 = 68,5\%$ ($T_{\text{pico DTG}} \sim 280\text{ }^{\circ}\text{C}$) em uma primeira etapa, no intervalo de temperatura de $161 - 323\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma outra perda de massa de $\Delta m_2 = 31,35\%$ ($T_{\text{pico DTG}} \sim 376\text{ }^{\circ}\text{C}$) no intervalo de temperatura de $323 - 459\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na curva termogravimétrica do Phospholipon[®] 80H pode ser observado que aconteceram quatro etapas de perda de massa, onde na primeira etapa a perda foi de $\Delta m_1 = 3.244\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 52,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, no intervalo de temperatura de $36,16 - 83\text{ }^{\circ}\text{C}$; a segunda etapa no intervalo de temperatura de $197,79 - 287,73\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_2 = 11.03\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 271,38\text{ }^{\circ}\text{C}$), a terceira no intervalo de temperatura de $290,56 - 336\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_3 = 45.58\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 325,78\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a quarta etapa de perda de massa ocorreu no intervalo de $339,30 - 370\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_4 = 23.99\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 348,11\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A curva termogravimétrica do tacrolimo mostrou quatro eventos de perda de massa, sendo que a primeira foi no intervalo de temperatura de $34,9 - 88,99\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_1 = 1.662\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 58,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), que é atribuído à evaporação da água presente no tacrolimo monohidratado (BOER *et al.*, 2013); a segunda no intervalo de temperatura de $200,3 - 283\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_2 = 28.45\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 253,14\text{ }^{\circ}\text{C}$), dando início a sua degradação; a terceira etapa de perda de massa em torno de $285,84 - 328,61\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_3 = 21.21\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 307,23\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a quarta e última etapa, no intervalo de temperatura de $332,38 - 466\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_4 = 42.09\%$, $T_{\text{pico DTG}} \sim 366\text{ }^{\circ}\text{C}$). Resultados similares foram relatados por Boer *et al.*, (2013) em seu estudo.

Portanto, os resultados mostraram que os componentes da formulação são viáveis para o desenvolvimento dos sistemas propostos, visto que, possuem estabilidade térmica na faixa de temperatura utilizada no método. Foi observado também que para posterior análise de DSC, seria necessário apenas uma temperatura em torno de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, otimizando assim, o tempo de análise.

4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

4.4.2.1 Análise dos componentes isolados e misturas físicas por DSC

As curvas de DSC dos componentes e misturas físicas estão apresentadas na Figura 14 e as temperaturas de fusão e entalpia estão expostas na Tabela 8.

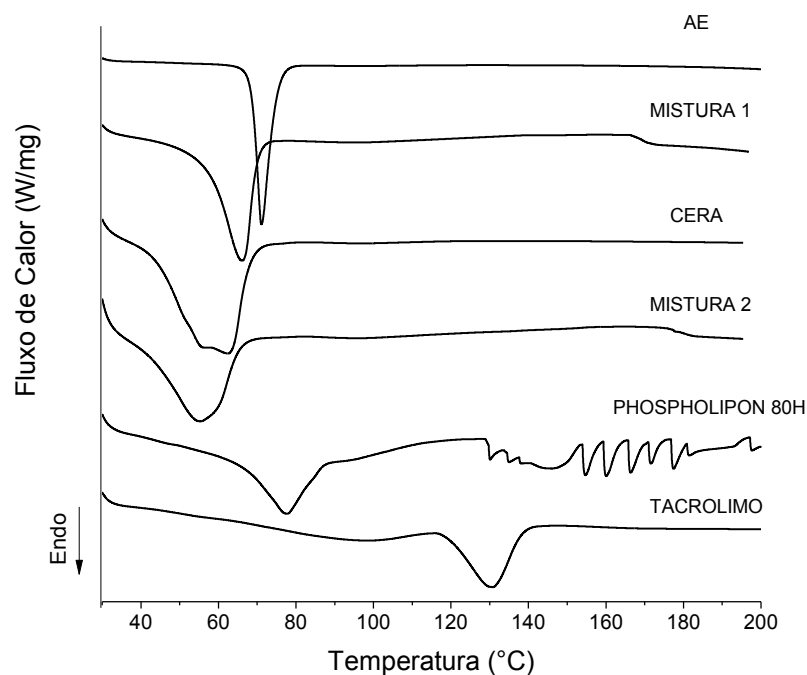


Figura 14: Curvas de DSC dos componentes e das misturas físicas (Mistura 1: Ácido esteárico + ácido oléico (30%) e Mistura 2: Cera de abelha + ácido oléico (30%)).

Tabela 8: Valores de transição endotérmica dos componentes e misturas físicas.

Amostra	Ponto de Fusão (°C)	T_{onset} (°C)	Entalpia de Fusão ΔH (J/g)
TACROLIMO	130.91	119.18	33.54
AE	71.07	68.53	184.40
CA	62.29	42.76	184.50
PHOSPHOLIPON® 80H	77.48	65.90	45.26
MISTURA 1	66.09	56.87	126.60
MISTURA 2	55.27	40.99	82.84

Na curva de DSC do AE pode ser observado um evento característico desse ácido graxo saturado, próximo a 71.07 °C (T_{onset} 68.53 °C) e entalpia de cerca de 184.4 J/g. Resultado semelhante está relatado na literatura por Severino *et al.*, (2011). Já a CA apresentou ponto de fusão mais baixo do que o AE, próximo a 62.29 °C (T_{onset} 42.76 °C) e entalpia praticamente semelhante, em cerca de 184.5 J/g. O que significa que os dois tipos de lipídios precisaram da mesma energia para romper suas forças de coesão (KAMEDA, 2005; ATTAMA; MULLER, 2008; KHERADMANDNIA *et al.*, 2010).

As misturas físicas de AE e AO (Mistura 1: 70 % AE + 30 % AO e Mistura 2: 70 % CA + 30 % AO) apresentaram, como esperado, temperatura e entalpia de fusão mais baixos do que os seus componentes isolados. Isso ocorre pela presença do lipídio líquido na amostra, causando uma desorganização do retículo cristalino, o que requer menor energia para superar as forças de coesão (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008; MARCATO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2012).

A curva do tacrolimo apresenta uma fase de transição endotérmica característico da fusão do fármaco próximo a 130.91 °C (T_{onset} 119.18 °C) com entalpia de cerca de 33.54 J/g. Além disso, próximo a 90 °C, houve um evento endotérmico associado a evaporação da água presente no tacrolimo monohidratado. Este evento também foi verificado nas análises de termogravimetria. Resultados semelhantes são encontrados na literatura (JOE; SHIN *et al.*, 2010; POPLE; SINGH, 2011; BOER *et al.* 2013).

A curva de DSC do Phospholipon[®] 80H mostrou ponto de fusão próximo à 77.48 °C (T_{onset} 65.90 °C) e entalpia de cerca de 45.26 J/g. Resultado similar foi encontrado na literatura por Wen *et al.*, 2013 e Jena *et al.*, 2014.

4.4.2.2 Análise das nanopartículas lipídicas de ácido esteárico por DSC

As curvas de DSC das amostras de NL de AE inerte e com fármaco (FK), estão apresentadas na Figura 15 e os dados das temperaturas e entalpia de fusão, exibidos na Tabela 9.

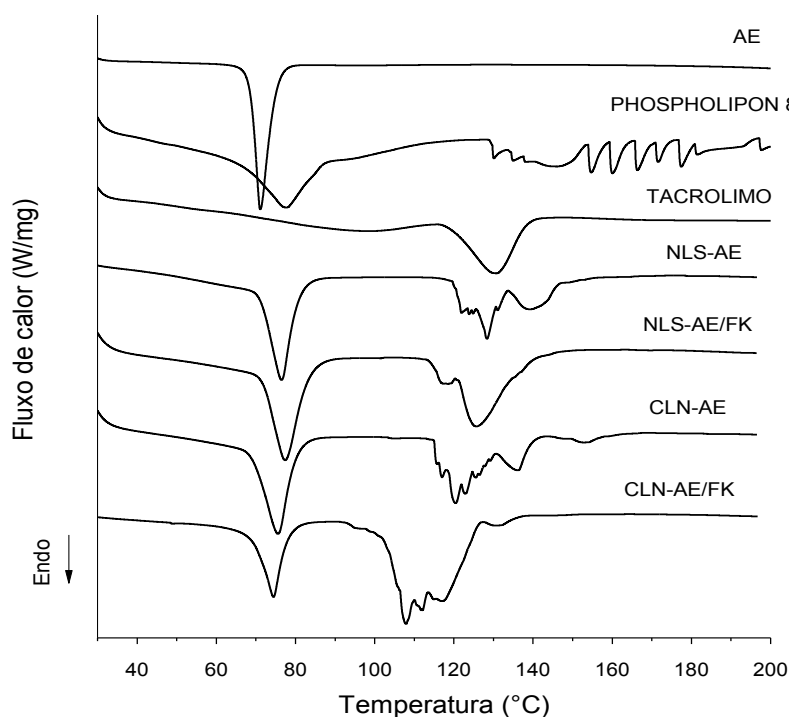


Figura 15: Curvas de DSC do AE, Phospholipon[®] 80H, tacrolimo e das NLS e CLN de AE inertes e com fármaco (FK).

Tabela 9: Valores de transição endotérmica das amostras de NL de AE inerte e com fármaco (FK).

Amostra	Ponto de Fusão (°C)	T _{onset} (°C)	Entalpia de Fusão ΔH (J/g)
AE	71.07	68.53	184.40
PHOSPHOLIPON [®] 80H	77.48	65.90	45.26
NLS-AE	76.47	70.37	263.3
NLS-AE/FK	77.30	70.83	308.3
CLN-AE	75.57	68.69	234.4
CLN-AE/FK	74.46	69.32	124.2

As curvas de DSC das NL de AE mostram apenas um evento endotérmico por volta de 76 °C correspondente a fusão da matriz lipídica nas nanopartículas. Este evento ocorreu em temperatura de fusão muito próxima a do Phospholipon® 80H isolado (77.48 °C), componente predominante na formulação.

Analisando os CLN, observa-se que com a incorporação de 30% de AO, houve uma redução da temperatura e entalpia de fusão, quando comparados com as NLS, conforme observado também nas misturas físicas. Nas NLS - AE a temperatura de fusão foi de 76.40 °C ($\Delta H = 263.3$ J/g) e nos CLN - AE foi de 75.56 °C ($\Delta H = 234.4$ J/g); nas NLS - AE/FK foi de 77.38 °C ($\Delta H = 308.3$ J/g) e nos CLN - AE/FK 74.46 °C ($\Delta H = 124.2$ J/g). Esta diminuição no ponto de fusão dos CLN é devido a maior desorganização do sistema e pode ser indicativo de uma melhor capacidade de encapsulação do fármaco (ATTAMA *et al.*, 2008). Assim, estes dados corroboram com os dados de teor do fármaco, onde valores maiores foram obtidos para os CLN.

Nas análises de DSC das NL de AE inerte e com fármaco (FK), observa-se que quando o tacrolimo é incorporado ao sistema, o pico de fusão das NL de AE permanece praticamente inalterado e quanto a identificação da presença do fármaco nas NL de AE, não foi possível, pois, neste estudo, o pico da fusão do fármaco pode estar sendo mascarado, devido a sua temperatura de fusão (130 °C) estar coincidindo com o momento de decomposição das amostras. O fármaco pode estar ainda solubilizado na matriz lipídica fundida ou homogeneamente disperso dentro da NL.

4.4.2.3 Análise das nanopartículas lipídicas de cera de abelha por DSC

As curvas de DSC das amostras de NL de CA inertes e com fármaco (FK) estão apresentadas na Figura 16 e os dados de temperatura e entalpia de fusão das partículas estão exibidos na Tabela 10.

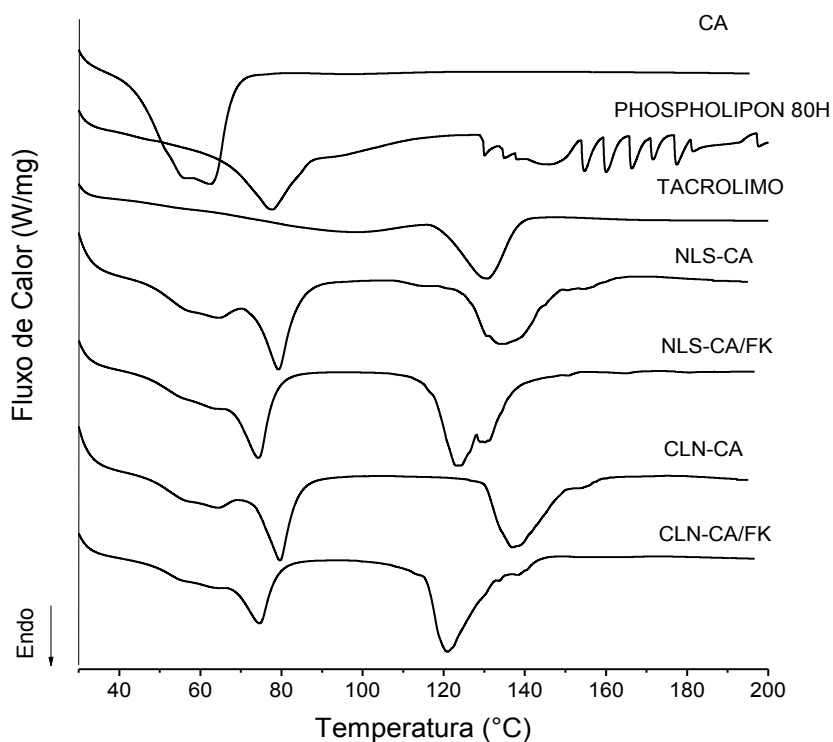


Figura 16: Curvas de DSC da CA, Phospholipon[®] 80H, tacrolimo e das NLS e CLN de CA inertes e com fármaco (FK).

Tabela 10: Valores de transição endotérmica das amostras de NL de CA inerte e com fármaco (FK).

Amostra	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	T _{1onset} (°C)	T _{2onset} (°C)	ΔH ₁ (J/g)	ΔH ₂ (J/g)
CA	62.29	-	42.76	-	184.50	-
PHOSPHOLIPON [®] 80H	-	77.48	-	65.90	-	45.26
NLS-CA	57.41	79.32	47.90	73.24	64.79	124.1
NLS-CA/FK	56.83	79.65	47.80	73.12	50.22	108.7
CLN-CA	55.71	74.43	50.83	68.23	8.25	107.6
CLN-CA/FK	55.49	74.69	50.76	68.56	12.10	80.33

T₁: Temperatura do pico de fusão do primeiro evento; T₂: Temperatura do pico de fusão do segundo evento; ΔH₁: Entalpia de fusão do primeiro evento; ΔH₂: Entalpia de fusão do segundo evento.

A curva de DSC das NLS de CA apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro (T₁) na faixa de 56 °C e o segundo (T₂) em 79 °C. O primeiro evento ocorreu em temperatura próxima a fusão da CA isolada. Já o segundo evento ocorreu em temperatura próxima a fusão do Phospholipon[®] 80H.

Quanto a incorporação de 30% de AO na matriz lipídica da NL de CA, houve uma redução da temperatura de fusão, e da entalpia, similar ao observado nos CLN de AE. O pico de fusão da NLS - CA foi de 57.41 °C ($\Delta H = 64.69$ J/g) para CLN - CA 55.71 °C ($\Delta H = 8.25$ J/g), mostrando que a presença do AO na matriz lipídica torna a estrutura menos ordenada (MARCATO *et al.*, 2009).

Nas curvas de DSC das NL de CA inertes e com fármaco (FK), pode ser observado que a incorporação do tacrolimo ao sistema parece não alterar o pico de fusão da NL, sugerindo que a encapsulação do fármaco na matriz lipídica sólida das NL de CA, desorganizou a sua estrutura, pressupondo que este estaria incorporado nos espaços de acomodação desse sistema. Similar ao observado nas nanopartículas de AE, o pico do tacrolimo a 130 °C não foi detectado de forma evidente nos termogramas de NL de CA, devido a sua temperatura de fusão ter coincidido com o momento de decomposição das amostras. Essa ausência de ponto de fusão do fármaco também foi observada por outros autores (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010; SHIN *et al.*, 2010; POPLE *et al.*, 2011).

4.4.2.4 Avaliação da interação fármaco:lipídio

Devido ao pequeno aumento da entalpia das NLS-AE/FK em relação as NLS-AE também foram analisadas e comparadas as curvas de DSC do AE recristalizado e da mistura física de AE com tacrolimo (Mistura 3: ácido esteárico + fármaco), Figura 17.

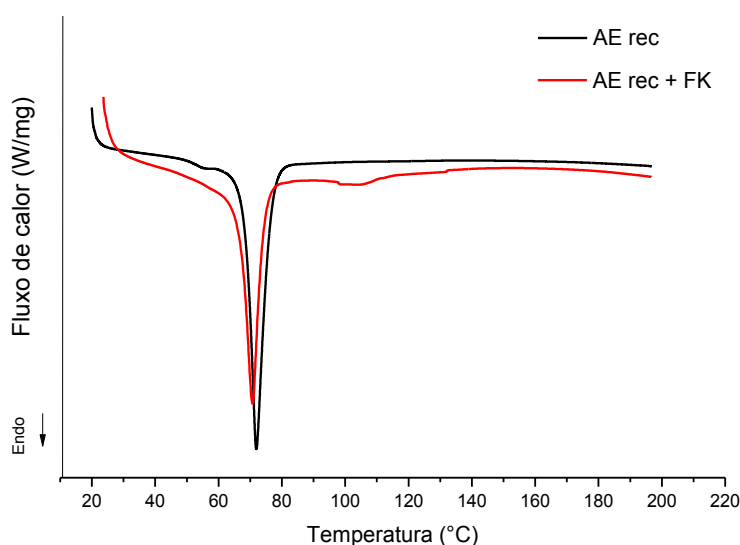


Figura 17: Análise da curva de DSC de AE recristalizado (preto) e Mistura 3 (vermelho).

O AE recristalizado foi utilizado para reproduzir as condições de obtenção das NL e obteve temperatura de fusão de 71.95 °C, próxima ao do AE empregado inicialmente na preparação das NL (não recristalizado), o que pode indicar que o processo de recristalização parece não ter alterado a estrutura cristalina do AE. Já na Mistura 3, com a incorporação do fármaco, pode ser observado que houve uma diminuição da temperatura de fusão para 70.74 °C. Ainda na Figura 17 é observado a presença de uma banda por volta de 100 °C, podendo estar relacionada à presença do tacrolimo.

As condições apresentadas podem indicar que não houve interação/incompatibilidade entre o tacrolimo e o AE (SHIN *et al.*, 2010).

Apesar das amostras de CA não terem indicado nenhum tipo de condição que estivesse relacionada a alguma interação/incompatibilidade entre os componentes utilizados, também foram realizadas curvas de DSC da CA recristalizada e da mistura física de CA com o tacrolimo (Mistura 4: cera de abelha + fármaco), Figura 18.

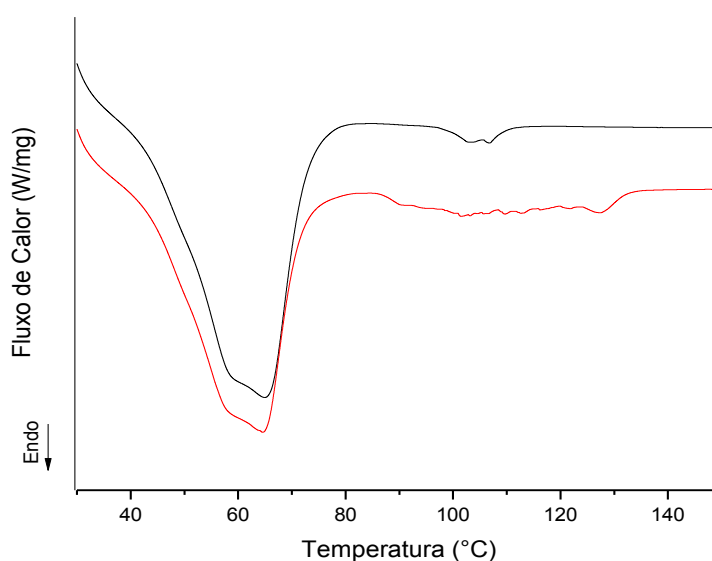


Figura 18: Análise da curva de DSC de CA recristalizada (preto) e Mistura 4 (vermelho).

Na Figura 18 foi possível observar que houve uma leve redução da temperatura de fusão da CA na Mistura 4 (64.55 °C), quando comparado com a CA recristalizada (64.92 °C), indicando que o fármaco desorganizou a estrutura da CA, tornando-a menos cristalina. Ainda na Figura 18, similar ao que aconteceu com a Mistura 3, na curva de DSC da Mistura 4 foi possível detectar um pico que pode

estar relacionado também à presença do tacrolimo por volta de 100°C a 128 °C, reforçando desta forma que provavelmente não houve interação entre o lipídio e o fármaco nas amostras.

Contudo, diante dos resultados obtidos, outros estudos utilizando técnicas adicionais também foram empregados para melhor avaliar se houve interação/incompatibilidade entre o fármaco e o AE utilizados nas NL.

4.5 Análise de Difração de raio-X (DRX)

4.5.1 Análise dos componentes isolados e misturas físicas por DRX

Os difratogramas dos principais componentes da formulação e das Misturas 1 e 2 estão ilustrados na Figura 19.

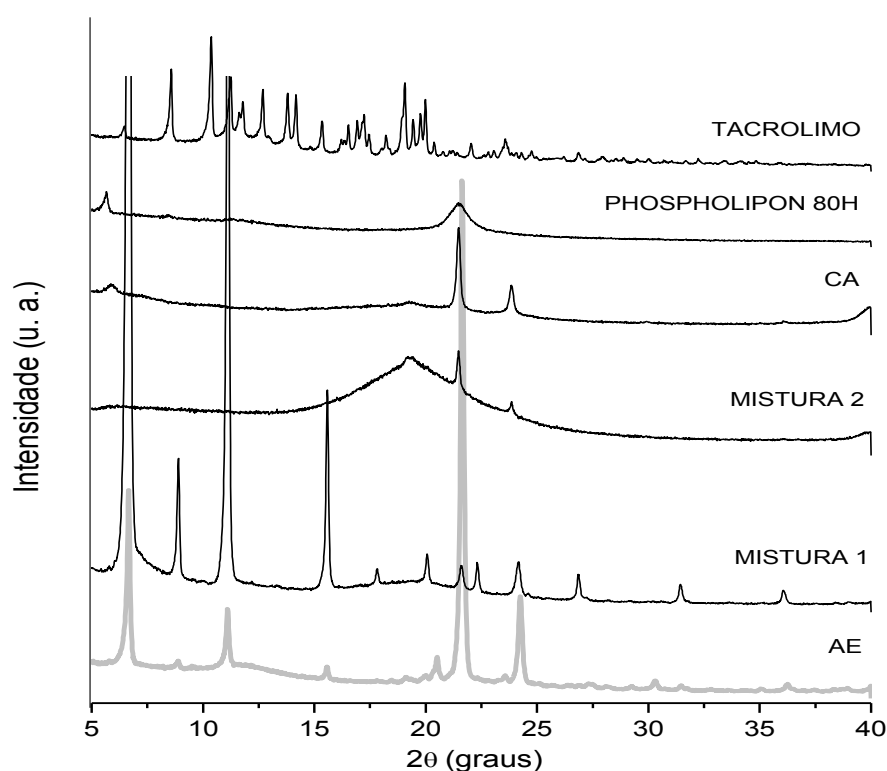


Figura 19: Difratogramas dos componentes e das misturas binárias (Mistura 1: Ácido esteárico + ácido oléico (30%) e Mistura 2: Cera de abelha + ácido oléico (30%)) e do AE puro.

Análises de DRX foram realizadas para avaliação da estrutura polimórfica de todas as amostras e avaliação da influência de alguns componentes na estrutura do lipídio, como a adição de lipídio líquido nos CLN e a incorporação do fármaco.

Assim como no estudo realizado por alguns autores, como Shin *et al.*, (2010), Joe *et al.*, (2010) e por Siddiqui *et al.*, (2013), o difratograma do tacrolimo exibiu vários picos intensos, sendo os de maiores intensidades em torno de $2\theta = 8.5^\circ$, 10° , 19° e 20° , característicos de sua natureza cristalina (RAHMAN *et al.*, 2014). Já o difratograma do Phospholipon® 80H apresentou um pico de intensidade reduzida em ângulo menor ($2\theta = 5.7^\circ$) e um pico intenso em torno de $2\theta = 21.5^\circ$, característico de sua estrutura ordenada. Resultado semelhante foi descrito por Jena *et al.* (2014).

Em relação aos lipídios, o difratograma da CA apresentou-se semelhante ao de estudos anteriores como o de Attama *et al.*, (2006 e 2008), mostrando picos finos e de alta intensidade em uma região de alto ângulo $2\theta = 21^\circ$ e 24° , indicando possuir uma estrutura ordenada, além de picos de intensidades menores em torno de $2\theta = 5.8^\circ$ e 19° . O difratograma do AE apresentou picos finos de altas intensidades característico de lipídios altamente cristalinos, principalmente localizado em torno de $2\theta = 21.5^\circ$ e 24° , como também foi relatado por Severino *et al.*, (2011), além de picos de menores intensidades em torno de $2\theta = 6.5^\circ$, 8.6° , 11° , 15° , 20° , 30° e 36° (GARG *et al.*, 2011).

Para poder observar modificações de cristalinidade dos lipídios utilizados quando adicionado o lipídio líquido (30 %) nos CLN, também foram realizadas análises de DRX das Misturas 1 e 2. Em relação à CA (Mistura 2), esta apresentou picos semelhantes ao da CA pura, porém, com intensidades reduzidas, e também o novo difratograma passou a apresentar uma pequena porção amorfa em torno de $2\theta = 19^\circ$ mostrando que juntamente com o lipídio líquido o novo composto é menos cristalino. O difratograma da Mistura 1 em relação ao difratograma do AE puro, apresentou aumento de intensidade dos picos nas regiões de baixo ângulo, em torno de $2\theta = 6.5^\circ$ e 11° , característico da formação de um *blend* entre os lipídios e redução de intensidade dos picos principais de maior ângulo (em torno de $2\theta = 21.5^\circ$ e 24°), além do aparecimento de uma porção amorfa em torno de $2\theta = 20^\circ$, indicando que o grau de cristalinidade desse composto é menor (GARG; SINGH, 2011). Essa modificação da cristalinidade da estrutura lipídica nas misturas mostra a perda da predominância das características estruturais dos lipídios puros, ou seja, mostra que houve a formação de um *blend*, entre os lipídios (GOMES *et al.*, 2011).

4.5.2 Análise das nanopartículas de ácido esteárico por DRX

Análises de DRX também foram realizadas para caracterizar a estrutura polimórfica das amostras de NL de AE inerte e com fármaco (FK), além de avaliar a influência do lipídio líquido nos CLN e do fármaco na organização da matriz lipídica (Figura 20).

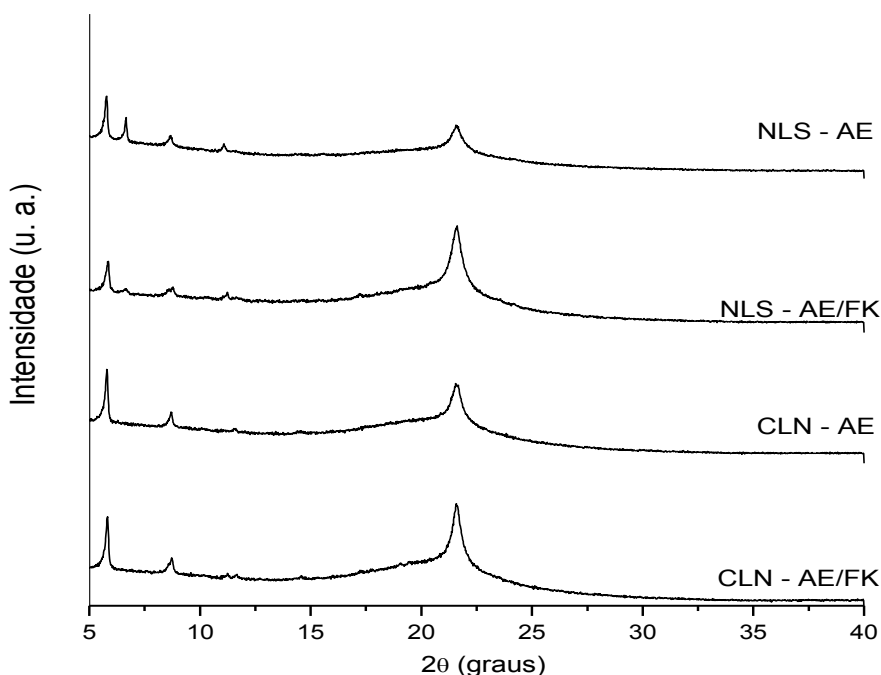


Figura 20: Difratomogramas das NL de AE inertes e com fármaco (FK).

Os difratogramas das NLS de AE apresentaram picos de menor intensidade em torno de $2\theta = 6.5^\circ$, 8.6° , 11° , também presentes no difratograma de AE puro. Além disso, estes difratogramas apresentaram picos semelhantes ao do Phospholipon[®] 80H puro, de intensidades reduzidas em ângulo menor ($2\theta = 5.7^\circ$) e um pico mais intenso em torno de $2\theta = 21.5^\circ$, característico da identidade do Phospholipon[®] 80H. Essa predominância das características estruturais do Phospholipon[®] 80H pode ser devido à associação do tensoativo à superfície da matriz lipídica e/ou a sua maior proporção (75%), em relação ao lipídio sólido, na composição das NL (SALMINEN *et al.*, 2014).

O difratograma das NL de AE sugere diminuição de cristalinidade da matriz lipídica (ATTAMA *et al.*, 2007; SALMINEN *et al.*, 2014). Com a adição do lipídio líquido nos CLN percebe-se que o difratograma passou a apresentar uma

pequena porção amorfa em torno de $2\theta = 19^\circ$, além do desaparecimento do pico na região do ângulo $2\theta = 6.5$, presente nos difratogramas das NLS de AE. Esses resultados juntamente com os dados obtidos por DSC indicam que houve uma redução do grau de cristalinidade nos CLN em comparação com as NLS (ATTAMA *et al.*, 2008), o que contribui para melhorar a eficiência de encapsulação do fármaco (FAN *et al.*, 2008).

Quando o tacrolimo foi adicionado à formulação, houve um pequeno aumento da intensidade do pico na região de $2\theta = 21,5^\circ$, tanto nas NLS-AE/FK quanto nos CLN-AE/FK, porém, também houve um pequeno aumento na intensidade da porção amorfa apresentada em torno de $2\theta = 19^\circ$.

Ainda na Figura 20, não foram visualizados picos característicos do fármaco nos difratogramas das NL de AE. Portanto, podemos presupor que o fármaco está na sua forma amorfa (YAMASHITA *et al.*, 2003) ou homogeneamente disperso na matriz lipídica das nanopartículas liofilizadas (SHIN *et al.*, 2010).

4.5.3 Análise de mistura física por DRX

Para melhor avaliação de interação/incompatibilidade entre o tacrolimo e o AE, também foram analisados e comparados os difratogramas do AE recristalizado e da Mistura 3 (Figura 21).

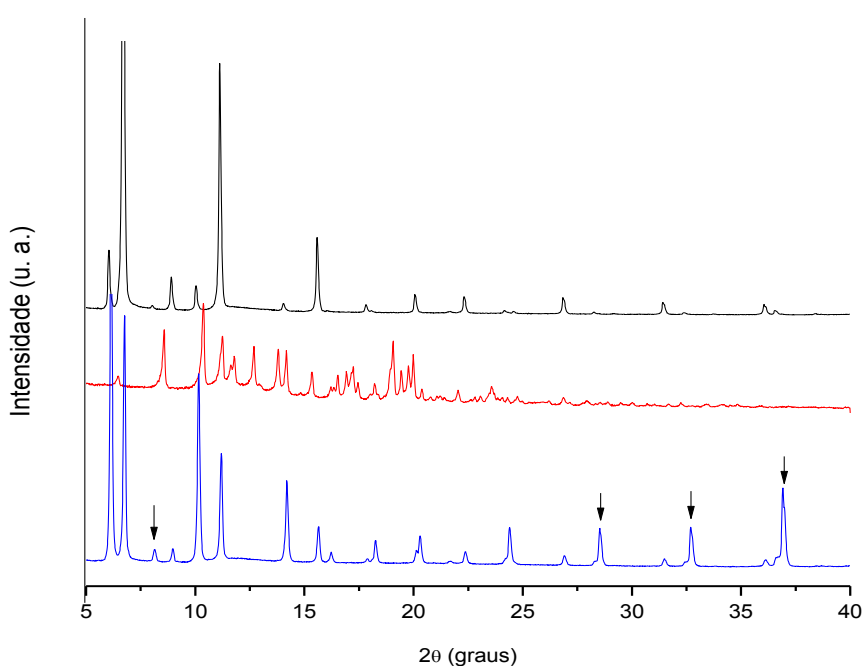


Figura 21: Difratograma do AE recristalizado (preto), do fármaco (vermelho) e da Mistura 3 (azul).

No difratograma da mistura física do AE com o tacrolimo (Mistura 3) foi possível observar picos característicos do AE recristalizado e alguns picos característicos do tacrolimo. Também foi observado que houve deslocamento de picos para ângulos mais altos e o aparecimento de novos picos em torno de $2\theta = 8^\circ$, 28.5° , 32.5° e 37° , representados pelas setas na Figura 21.

A formação de um difratograma diferente (Mistura 3), pode sugerir uma interação física entre o fármaco e o AE utilizado, formando um novo sistema, porém, sem perder suas características químicas.

4.5.4 Análise das nanopartículas de cera de abelha por DRX

Assim como para as NL de AE, análises de DRX também foram realizadas para amostras de NL de CA inertes e com fármaco (FK) (Figura 22).

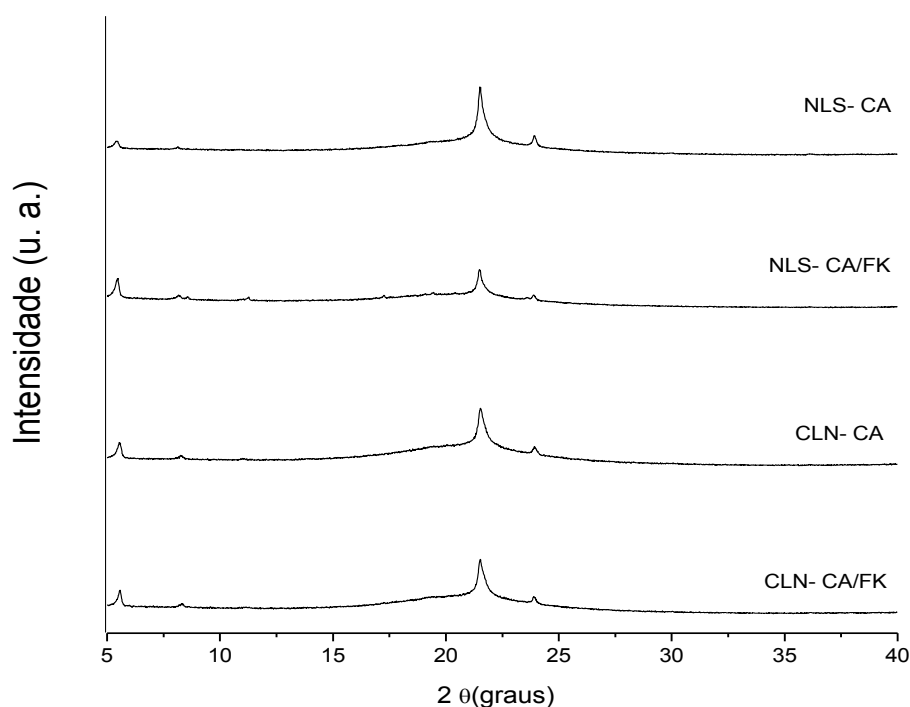


Figura 22: Difratogramas das NL de CA inertes e com fármaco (FK).

Os difratogramas das NL de CA apresentaram picos de menor intensidade em torno de $2\theta = 5.5^\circ$, 8° , 21.5° e 24° , semelhantes aos apresentados no difratograma de CA pura e no do Phospholipon® 80H. Quando o lipídio líquido foi adicionado nos CLN houve redução de intensidade desses picos, além da curva do difratograma ter passado a apresentar uma pequena porção amorfa em torno de 2θ

= 19°, indicando que houve redução do grau de cristalinidade quando comparados com as NLS de CA (ATTAMA *et al.*, 2008).

Em relação ao fármaco, quando o tacrolimo foi adicionado à formulação houve uma diminuição da intensidade e da área do pico na região de $2\theta = 21.5^\circ$ nas NLS-CA/FK, sugerindo menor grau de cristalinidade e nos difratogramas de CLN-CA e CLN-CA/FK não foi possível observar nenhuma modificação. Diante desses resultados podemos excluir a possibilidade de interação entre o fármaco e a matriz lipídica de CA.

Ainda na Figura 22, também não foi possível a identificação dos picos característicos da cristalinidade do fármaco, então, podemos supor que o fármaco pode estar na sua forma amorfa ou homogeneamente disperso na matriz lipídica das nanopartículas liofilizadas (YAMASHITA *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2010).

O grau de cristalinidade reduzido dos CLN observado nos resultados de DRX juntamente com DSC sugere que este é o sistema carreador mais adequado para incorporação do tacrolimo, tanto nas amostras de AE quanto de CA. Essa redução no grau de cristalinidade pode ser justificado pela interação do lipídio sólido com o lipídio líquido e o tensoativo, que gera aumento de tensão de superfície da partícula, o que reduz a energia necessária para ruptura das forças de coesão da estrutura cristalina (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008; MARCATO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2012); ou devido ao tamanho pequeno das partículas destes carreadores que amplificam a eficácia da técnica de ultrassonicação (SCHUBERT *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2008; MARCATO *et al.*, 2009).

A formação desse sistema nanoparticulado de cristalinidade reduzida é muito importante, pois, influência diretamente na quantidade de fármaco encapsulado, já que maiores imperfeições no cristal geram mais espaços para sua veiculação (FAN *et al.*, 2008); influencia também na velocidade de liberação do fármaco e na expulsão do fármaco durante o processo de estocagem (HAN *et al.*, 2008; MARCATO *et al.*, 2009).

Dados de teor de fármaco presentes nas NL obtidos neste trabalho confirmam a maior capacidade dos CLN em acomodar o fármaco, resultando em maior porcentagem de encapsulação, principalmente nos CLN obtidos à base de CA, podendo futuramente representar sistemas promissores para a veiculação do tacrolimo.

4.6 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de FTIR do tacrolimo foi realizado para identificar possível interação entre ele e o AE utilizado nas NL, anteriormente sugerido pelas técnicas de DSC e DRX (Figura 23).

Foi possível observar bandas principais em 3450 cm^{-1} referente ao estiramento O-H, em 2810 cm^{-1} referente ao estiramento C-H de alcanos, em 1741 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de éster e cetona, em 1639 cm^{-1} referente ao estiramento N-H de amida, em 1635 cm^{-1} referente ao estiramento C=C, 1194 cm^{-1} referente ao estiramento C-O de éster e em 1172 cm^{-1} e 1093 cm^{-1} referente ao estiramento C-O-C de éter (NAMIKI *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 2003).

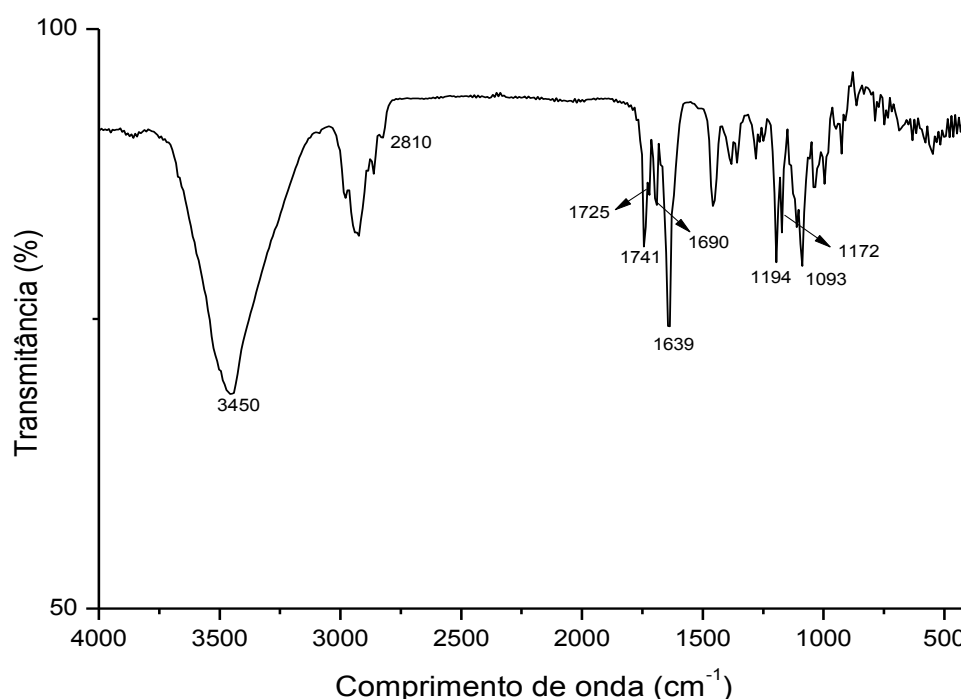


Figura 23: Espectro de FTIR do tacrolimo.

Amostras do AE, Phospholipon[®] 80H e Mistura 5 (mistura física de AE com Phospholipon[®] 80H) também foram analisadas (Figura 24).

Foi possível observar que o espectro do AE, assim como já relatado por Singh *et al.*, (2011), foi caracterizado pelo aparecimento de picos a 1464 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} indicando a presença do estiramento (C-O), assim como o do Phospholipon[®]

80H, que também apresentou picos em regiões semelhantes (1473 cm^{-1} e 1420 cm^{-1}) além de outros picos em regiões diferentes. Na Mistura 5, a mistura de AE com 75% de Phospholipon® 80H, mostrou pico semelhante ao do AE a 1464 cm^{-1} , mas em 1410 cm^{-1} o pico desapareceu quando comparada com a da mesma banda do pico do AE. Contudo, observando esses espectros podemos concluir que nessa mistura do lipídio com o tensoativo houve uma predominância das características do Phospholipon® 80H em relação ao AE, o que pode ser justificado pela sua maior proporção. Dados semelhantes foram encontrados por DRX, os quais mostraram que os difratogramas das NL se assemelhavam com o do Phospholipon® 80H puro.

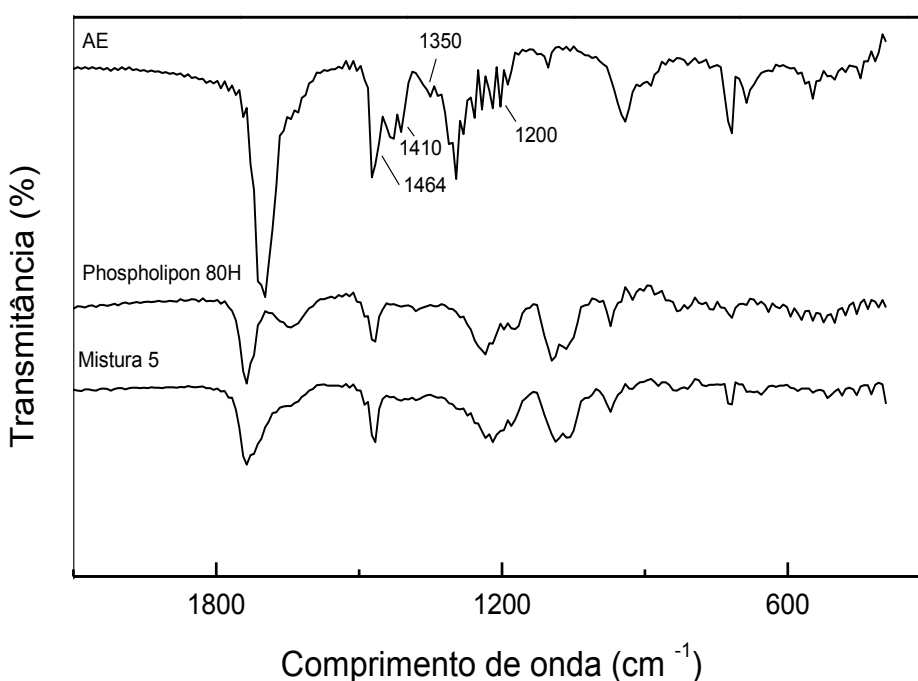


Figura 24: Espectro de FTIR do AE, Phospholipon® 80H e Mistura 5 na região de 2100 a 300 cm^{-1} .

As amostras liofilizadas de NLS de AE também foram analisadas por este método, onde os espectros das NLS - AE inerte e NLS - AE/FK mostraram que os picos referentes ao estiramento C-O do AE em 1410 cm^{-1} desapareceu. Este acontecimento pode ser atribuído apenas a presença do Phospholipon® 80H e a sua predominância sobre a superfície das nanopartículas (Figura 25).

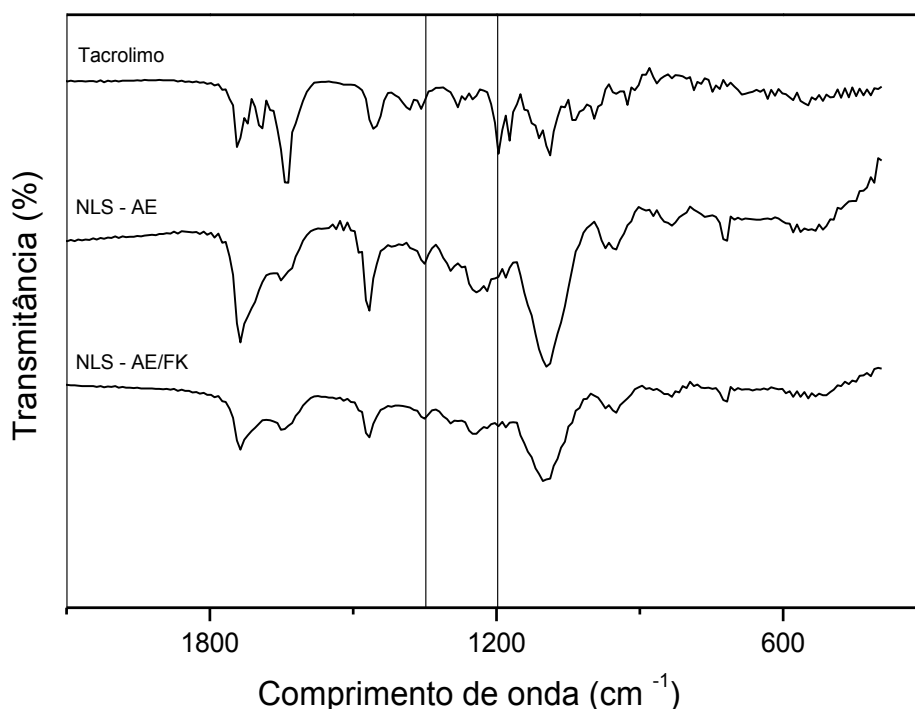


Figura 25: Espectro de FTIR do tacrolimo, NLS – AE inerte e NLS – AE/FK na região de 2100 a 300 cm^{-1} .

Segundo Garg *et al.*, (2011), picos nas regiões entre 1200 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} podem ser úteis para caracterização conformacional sobre os grupos $-\text{CH}_2$ presentes na estrutura cristalina do lipídio, podendo fornecer informações em relação à estrutura lipídica do material formado. Contudo, poderam ser observados picos nessas regiões de $1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ no AE e no Phospholipon[®] 80H. No entanto, os espectros das NLS de AE não apresentaram picos nesse intervalo, sugerindo a formação de estruturas menos ordenadas, podendo ser justificado devido a dimensão reduzida das partículas lipídicas formadas.

Ainda na Figura 25, pode também ser observado que houve sobreposição do espectro das NLS, porém, a presença do tacrolimo não pode ser identificada no espectro da NLS-AE/FK devido ao não aparecimento das bandas referentes aos seus grupamentos químicos, o que talvez possa ter ocorrido devido à adequada distribuição do fármaco entre as cadeias poliméricas do lipídio, relacionado a sua baixa proporção utilizada na preparação da amostra em relação ao lipídio (1:4) (SOUZA, 2012).

Contudo, conforme relatado por Pople *et al.*, (2011), a sobreposição dos espectros da formulação inerte com a formulação com fármaco, sem a possível

identificação de qualquer novo pico, ainda pode ser sugestivo de que não houve nenhum tipo de interação ou incompatibilidade na formulação, contribuindo com resultados sugeridos pelas técnicas anteriores.

Além disso, também foi realizada análise da Mistura 3 para ser comparada com o espectro de AE puro e com o espectro do fármaco (Figura 26).

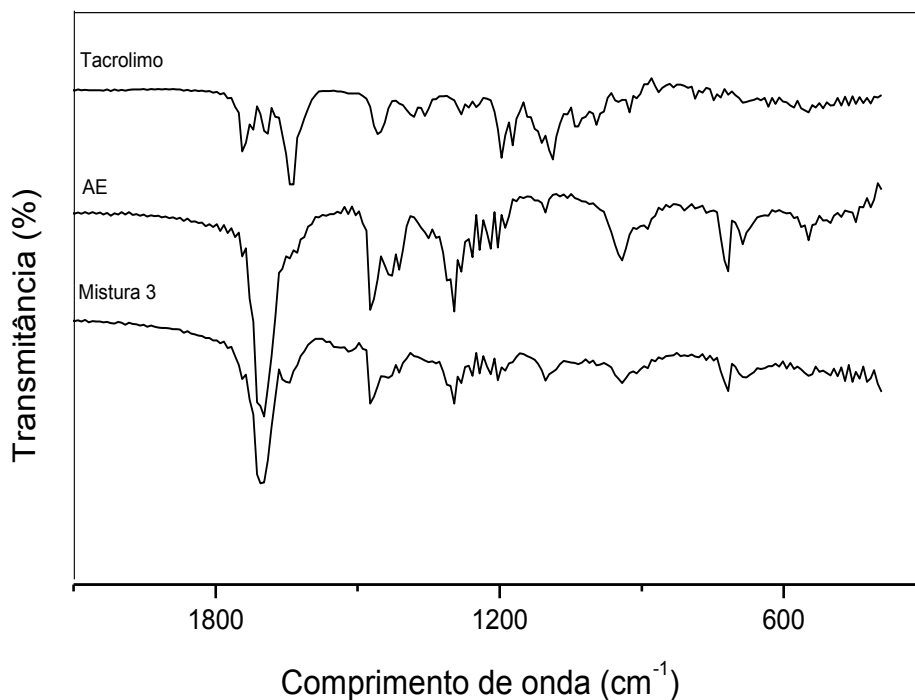


Figura 26: Espectro de FTIR do AE, tacrolimo e Mistura 3 na região de 2100 a 300 cm^{-1} .

No espectro de FTIR da Mistura 3 foi possível observar similaridade ao espectro do AE puro, com identificação também de algumas bandas do fármaco, de modo que, não apresentou nenhuma outra banda que não já existisse em seus componentes isolados. Então, podemos concluir que pela técnica utilizada, não foi possível identificar interação entre o fármaco e o AE utilizado.

CONCLUSÃO

- As análises de caracterização dos principais componentes utilizados para o desenvolvimento das NL demonstram a viabilidade do processo proposto neste trabalho para obtenção das NL;
- O desenvolvimento das NL de ácido esteárico e de cera de abelha pelo método proposto foi satisfatório, de modo que foi possível obter partículas de tamanho nanométrico;
- A incorporação do tacrolimo nas nanopartículas de ácido esteárico e de cera de abelha provocou modificação no tamanho da partícula e no potencial zeta quando comparado às nanopartículas inertes;
- A padronização do método analítico por CLAE-UV mostrou-se eficaz e assim o teor de tacrolimo encapsulado nas NL pode ser calculado;
- O desenvolvimento e caracterização dos sistemas obtidos utilizando o ácido esteárico e a cera de abelha como lipídios sólidos apresentaram resultados satisfatórios, porém, as nanopartículas de cera de abelha mostraram ser o melhor sistema nesse estudo, devido ao seu maior teor;
- Os CLN mostraram ser o sistema de maior capacidade de encapsulação do fármaco tanto entre as nanopartículas de ácido esteárico quanto de cera de abelha, devido ao seu maior teor;
- As análises realizadas para investigar se houve interação ou incompatibilidade entre o tacrolimo e lipídio utilizado mostraram uma provável interação física entre o tacrolimo e o ácido esteárico, com a formação de um novo sistema com as mesmas características químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. M. et al. Polyoxyl 60 hydrogenad castor oil free nanosomal formulation of immunosuppressant Tacrolimus: Pharmacokinetics, safety, and tolerability in rodents and humans. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 325-330, 2010.

ALOMAR A., BERTH-JONES J., BOS J.D., GIANNETTI A., REITAMO S., RUZICKA T. The role of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. **Br J Dermatol.**, v. 151, p.3-27, Nov. 2004.

ATTAMA, A. A., SCHICKE, B. C., PAEPENMULLER, T., MULLER-GOYMANN, C. C., Solid lipid nanodispersion containing mixed lipid core and polar heterolipid: Characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 67, p. 48-57, 2007.

ATTAMA, A. A., MULLER-GOYMANNA, C.C., Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Physicochem and Eng. Aspects**, v. 315, p.189–195. Feb. 2008.

BARREIRO, C., PRIETO, C., SOLA, I. A., SOLERA, E., MARTÍNEZ, C. M., PÉREZ, R.R, GARCÍA, E.C., APARICIO, J.F., FERNÁNDEZ, M.L.T., SANTOS, A. J. Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). **Journal of Bacteriology**, v.194, p.3756-3757, July. 2012.

BENSON, H.A.E. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. **Curr Drug Deliv**, Perth, v.2, n.1, p.23-33, 2005.

BENSON, A., BARRETT, T., SPARBERG, M., BUCHMAN, A. L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, n.1, p. 7-12, 2008.

BRAIN, K. R., GREEN, D. M., LALKO, J., API, A. M. In- vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. **Toxicol In Vitro**, USA, v.21, n. 1, p.133-138, Feb. 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003.

BOER, T.M., PROCÓPIO, J.V.V., DO NASCIMENTO, T.G., MACÊDO, R.O. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.73, p. 18-23, Jan. 2013.

BOGUNIEWICZ, M., SCHMID-GRENDELMEIER, P., LEUNG, D.Y.M. Atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 118, n. 1, p. 40–43, July. 2006.

BONVEHI, J.S., BERMEJO, F.J.O. Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. **Food Chemistry**, v.132, p.642–648, May. 2012.

CASTRO, A.P.B.M. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. Inibidores de calcineurina no tratamento das dermatoses alérgicas. **Jornal de Pediatria**. v. 82, N°5(Supl), 2006.

CASTRO, G.A., FERREIRA, L.A. Novel vesicular and particulate drug delivery systems for topical treatment of acne. **Expert Opin Drug Deliv**. Belo Horizonte, v.5, n.6, p.665–679. June. 2008.

DAS, S. et al. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p.139–151, 2012.

DONG, Y et al. Solid lipid nanoparticles: Continuous and potential large-scale nanoprecipitation production in static mixers. **Colloids Surf, B Biointerfaces**, n. 94, p. 68-72, 2012.

FANG, J.Y., FANG, C.L., LIU, C.H., SU, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructures lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, n.2, p.633–640, Oct. 2008.

GAO, S. et al. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of tacrolimus-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded albumin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. n. 427, p. 410–416, 2012.

GARCIA, S.C., LOPES, L.S., SCHOTT, K.L., BECK, S.T., POMBLUM, V.J.J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **J Bras Patol Med Lab**. v.40, p.393-401, 2004.

GARG, V., JAIN, G.K., NIRMAL, J., KOHLI, K., Topical tacrolimus nanoemulsion, a promising therapeutic approach for uveitis. **Medical Hypotheses**, v.81, n.5, p.901–904, Nov. 2013.

GARG, A., SINGH, S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 87, p. 280–288, 2011.

GEOBEL, A.S.B., NEUBERT, R.H.H., WOHIRAB, J., Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.404, n.1-2, p.159–168, Feb. 2011.

GOLDBLATT, F., ISENBERG, D.A. New therapies for rheumatoid arthritis. **Clin Exp Immunol**. v. 140, n.2, p.195-204, 2005.

GOMES, G. V. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DE SISTEMAS LIPÍDICOS SÓLIDOS MICRO E NANOPARTICULADOS UTILIZADOS

NA ENCAPSULAÇÃO DE BETACAROTENO. Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Pirassununga, 2011.

GONTIJO, B., DUARTE, G., SITTART, J.A. de S., PIRES, M.C., TAKAOKA, R., CESTARI, S. da C. P. Avaliação da eficácia e segurança do tacrolimo pomada 0,03% no tratamento da dermatite atópica em pacientes pediátricos. **In. An. Bras. Dermatol.** v.83, n.6 Rio de Janeiro Nov./Dec, 2008.

GOTO, T. et al. Discovery of FK 506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Transplantation Proceedings**. v. 5, p. 4-8, 1987.

HAN, F., Li, S., Yin, R., Liu, H., Xu, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 315, p. 210–216, 2008.

HOW, C. W., RASEDEE, A., MANICKAM, S., ROSLI, R. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity. **Colloids Surf, B Biointerfaces**. v. 112, p. 393-99, 2013.

HU, F. Q.; Yuan, H.; Zhang, H. H.; Fang, M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **Int. J. Pharm.**, v. 239, p. 121-128, 2002;

HU, F. Q. et al. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids Surf, B Biointerfaces**. v. 45, p. 167-73, 2005.

ITALIA, J. L. et al. Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 6, p. 1324-1331, 2009.

JENA, K. et al. Development of tamoxifen-phospholipid complex: Novel approach for improving solubility and bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 473 p. 1–9, 2014.

JENNING, V., GOHLA, S. H. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). **J Microencapsul**, Berlin, v.18, n.2, p.149–58, 2001.

JENSEN, L.B., PETERSSON, K., NIELSEN, H.M., In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p.68–75, Sep. 2011.

JOSEPH, M. A., KAUFMAN, H. E., INSLER, M. Topical tacrolimus ointment for treatment of refractory anterior segment inflammatory disorders. v. 24, n.4, p.417-20, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAMEDA, T. ^{13}C solid-state NMR analysis of heterogeneous structure of beeswax in native state. **Journal of Physics D: Applied Physics**. n. 38, p. 4313–4320, 2005.

KHERADMANDNIA *et al.* Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 6, p. 753 – 759, 2010.

KOROTKOV, K.; GARCIA, R. Computadorized analysis of pigmented skin lesions: A review. **Artificial Intelligence in Medicine**, v. 56, p. 69-90, 2012.

LEI, W., Yu, C., Lin, H., Zhou, X. Development of tacrolimus-loaded transfersomes for deeper skin penetration enhancement and therapeutic effect improvement in vivo. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 336 – 345, 2013.

LERDKANCHANAPORN, S., DOLLIMORE, D. An investigation of the evaporation of stearic acid using a simultaneous TG-DTA unit. *Thermochimica Acta*, n. 324. p.15-23, 1998.

LEUNG, D. Y., SOTER, N. A. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol.**, v. 44 (1 Suppl):S1-12, 2001.

LEUNG D. Y., BOGUNIEWICZ, M., HOWELL, M. D., NOMURA, I., HAMID, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **J Clin Invest.**, v. 113, p. 651-7, 2004.

LIPPACHER, A., MULLER, R. H., MADER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles 5. **Int. J. Pharm.**, v. 214, n. 1-2, p. 9-12, 2001.

MAIA, C. S., MEHNERT, W., SCHAFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **Int. J. Pharm.**, v. 196, n.2, p. 163-167, 2000.

MAIA, M., NUNES, F. M., Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. **Food Chemistry**, Vila Real, v.136, n.2, p. 961–968, Jan. 2013.

MAGARI, K., MIYATA, S., OHKUBO, Y, MUTOH, S. Inflammatory cytokine levels in paw tissues during development of rat collagen-induced arthritis: effect of FK506, an inhibitor of T cell activation. **Inflamm Res.**, v. 53, n.9, p.469-474, 2004.

MARCATO, P. D. et al. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia* v. 6, n. 2, p.1-37, 2009.

MARTINS, S., COSTA, L. S., CARNEIRO, T., CORDEIRO, DA S. A., SOUTO, E. B., FERREIRA, D. C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: Na investigation of the uptake mechanism and pathway. **Int J Pharm.** v. 430, p. 216-27, 2012.

MEHNERT, W., MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 47, n.2-3, p. 165-196, 2001.

MEHNERT, W., MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MONTENEGRO, L., SINICO, C., CASTANGIA, I., CARBONEA, C., PUGLISI, G. Idoxuridine-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: In vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.434, p.169– 174, 2012.

MOREIRA, M. Estudo da ação do imunossupressor tacrolimus na pancreatite aguda experimental induzida pela arginina. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

MÜLLER, R. H., MAËDER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**. v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MULLER, R. H., RADTKE, M., WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v 54, Suppl.S131 –S155, 2002.

NAMIKI, Y., KIHARA, N., KODA, S., HANE, K., YASUDA, T. Tautomeric phenomenon of a novel potent immunosuppressant (FK506) in solution. I. Isolation and structures determination of tautomeric compounds. **The Journal of antibiotics**, v.46 (7), p.1149-1155, 1993.

NAM, S. H. X. Y. J., PARK, J. S. Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery. **Bull. Korean Chem. Soc.** Seoul, v. 32, n. 3, 2011.

PALLER, A., EICHENFIELD, L. F., LEUNG, D. Y, STEWART, D., APPELL, M. A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients. **J Am Acad Dermatol.**, v.;44(1 Suppl):S47-57, 2001.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **Int. J. Pharm.**, v. 366, p. 170–184. 2009.

PARK, Y. J. *et al.* Physicochemical characterization of tacrolimus-load solid dispersion with sodium carboxymethyl cellulose and sodium lauryl sulfate. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n.6, p. 893-898, 2009.

PETRY, V., BESSA, G.R., POZIOMCZYCK, C.S., DE OLIVEIRA, C.F., WEBER, M.B., BONAMIGO, R.R., D'AZEVEDO, P.A., Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. In: **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.87, n.5, p.729-734, 2012.

POPLE, P. V., SINGH, K. K. Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. **Int. J. Pharm.**, v. 398, p. 165-178, 2010.

POPLE, P. V., SINGH, K. K. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 82-94, 2011.

POPLE, P. V., SINGH, K. K. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus, Part II – In vivo assessment, drug targeting, efficacy, and safety in treatment for atopic dermatitis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, p.72–83, 2013.

PORTO, A. C., SIMÃO, H. M. L. Dermatite Atópica. In: Lopez FA, Campos Jr. D. In: Tratado de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria.-2.ed –Barueri, SP: Manole, p. 577-589, 2010.

RAHMAN, Z., SIDDIQUI, A., BYKADI, S., KHAN, M. A. Khan Determination of tacrolimus crystalline fraction in the commercial immediate release amorphous solid dispersion products by a standardized X-ray powder diffraction method with chemometrics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.475, p. 462–470, 2014.

RIBEIRO, M. D. M. M., ARELLANO, D. B., GROSSO, C. R. F. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. **Food Res Int**, v. 47, p. 38-44, 2012.

RICCI-JÚNIOR, E., MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 310, p. 187–195, 2006.

RYBOJAD, M. La dermatite atopique. **Archives de pédiatrie** 19 , p. 882-885, Jul. 2012.

RODRIGUES, R. N. S., PIRES, M. C., GRUMACH, A. S. Macrolídeos tópicos: uma nova perspectiva para o tratamento da dermatite atópica. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 27, n.2, p.70-75, 2004.

SHAH, S. S.; DENHAM, L. V.; ELISON, J. R.; BHATTACHARJEE, P. S.; CLEMENT, C.; HUQ, T.; HILL, J. M. Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. **Expert Review of Ophthalmology**, v.5 (1), p.75-93, 2010.

SALMINEN et al. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 426, p. 256-263, 2014.

SEVERINO, P., PINHO, S. C., SOUTO, E. B., SANTANA, M. H. A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids Surf, B Biointerfaces**, v. 86, p. 125-30, 2011.

SCHACHNER, L. A. et al., Tacrolimus Ointment 0.03% Is Safe and Effective for the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis in Pediatric Patients: Results From a Randomized, Double-Blind, Vehicle-Controlled Study. **Official journal of the American Academy of Pediatrics**. v.116, n. 3, Sep. 2005.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLACOSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v.56, n.3, p. 501-505, 2003.

SCHMIDTS, T. DOBLER, D., NISSING, C., RUNKEL, F. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 338, p. 184–192, 2009.

SCHUBERT, M. A., MULLER-GOYMANN, C. C. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence os lecithin and nonionic emulsifier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 61, p. 77-86, 2005.

SCHUBERT, M. A., HARMS, M., MULLER-GOYMANN, C. C. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. **European journal of pharmaceutical sciences**. v. 27, p.226-236, 2006.

SILVA, J.A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.31, n.3, p.125-131, 2010.

SILVA, A. C. et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone – loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids Surf, B Biointerfaces**, v. 86, p.158-65, 2011.

SHIN, S. B., CHO, H. Y., KIM, D. D., CHOI, H. G., LEE, Y. B. Preparation and evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.74, p.164-171, 2010.

SOLE, D. et al. Brazilian ISAAC Group. Prevalence of atopic eczema and related symptoms in Brazilian schoolchildren: results from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase 3. **J Investig Allergol Immunol.**, v.16, p. 367-376, 2006.

SOUTO, E. B., WISSING, S. A., BARBOSA, C. M., MULLER, R. H., Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.71–77, 2004.

SOUTO, E. B. SLN and NLC for topical delivery of antifungals. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universitat Berlin. Berlim, Alemanha, 2005.

SPERGEL, J. M., LEUNG, D. Y. Safety of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: evaluation of the evidence. **Curr Allergy Asthma Reports**, v.6, n.4, p.270-274, 2006.

SOUZA, M. C. M. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DE IMPLANTAÇÃO INTRAOCULAR CONTENDO TACROLIMUS PARA O TRATAMENTO DE UVEÍTES CRÔNICAS. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Belo Horizonte, 2012.

SWART, H., BREYTENBACH, J. C., HADGRAFT, J., PLESSIS, J. Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters. **Int J Pharm.** v.301, n.1-2, p.71-79, Sep. 2005.

TEERANACHAIDEEKUL, V., JUNYAPRASERT, V. B., SOUTO, E. B., MULLER, R. H. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 354, p. 227-234, 2008.

TIWARI, R., PATHAK, K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. **Int J Pharm.**, v. 415, p. 232-43, 2011.

UNER, M. Preparation, characterization and physic-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n.5, p.375-386, 2006.

UPRIT, S., SAHU, R. K., ROY, A., PARE, A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 21, p. 379-86, 2013.

VAGHASIYA, H., KUMAR, A., SAWANT, K., Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafinehydrochloride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, p.311–322, 2013.

VENKATARAMANAN, R. et al. Biopharmaceutical Aspects of FK-506. **Transplantation Proceedings**, v.19 (5-6), p.30-35, 1987.

ZAHIR, H., NAND, R.A., BROWN, K.F., TATTAM, B.N., MCLACHLAN, A.J. Validation of methods to study the distribution and protein binding of tacrolimus in human blood. **J. Pharmacol. Toxicol Methods**, v.46, n.1, p.27–35, 2001.

ZHAO, C et al. Preparation, macrophages targeting delivery and anti-inflammatory study of pentapeptide grafted nanostructured lipid carriers. **Int J Pharm.** v.450, p.11-20, 2013.

ZHUANG, C. Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 394, p. 179-185, 2010.

WANG, S et al. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies. **Int J Pharm**, v.430, p. 238-46, 2012.

WEYENBERG, W. et al. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p. 291-298, 2007.

WEN, C. J. et al. Nanocomposite liposomes containing quantum dots and anticancer drugs for bioimaging and therapeutic delivery: a comparison of cationic, PEGylated and deformable liposomes. **Nanotechnology**, n. 24, p.325101, 2013.

WISSING, S. A., KAYSER, O., MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WOKOVICH, A. M et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **Eur J Pharm Biopharm**, v.64, n.1, p.1-8, Jan. 2006.

YAMASHITA, K et al. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. **International Journal of Pharmaceutics**, v.267, p.79-91, 2003.

YOSHIDA, T et al. Aminoalkyl methacrylate copolymers for improving the solubility of tacrolomus. I: Evaluation of solid dispersion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 428, n. 1-2, p. 18 – 2, 2012.

YUAN, H et al. Preparation and characteristics of nanostrutured lipid carries for control-realeasing progesterone by melt-emulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 174-179, 2007.